

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Evaluation pharmacologique d'indanesulfonamides en tant qu'inhibiteurs d'anhydrases carboniques

Frankart, Aurélie

*Award date:*  
2006

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



---

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR

**Faculté des Sciences**

**EVALUATION PHARMACOLOGIQUE D'INDANESULFONAMIDES EN TANT  
QU'INHIBITEURS D'ANHYDRASES CARBONIQUES**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licencié en Sciences biologiques**

Aurélié FRANKART

Juin 2006

Au terme de ce mémoire en vue de l'obtention du diplôme de licencié en Sciences biologiques, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à son élaboration :

*le professeur B. Masereel, Directeur du Département de Pharmacie, pour son accueil dans son laboratoire, pour sa supervision et ces conseils tout au long de ce travail ;*

*A. Thiry du Département de Pharmacie pour sa grande implication dans mon travail, pour ses multiples encouragements, ses conseils, sa patience, sa disponibilité, sa joie de vivre ainsi que pour le regard critique qu'elle a porté sur mon travail ;*

*le Docteur S. Rolin-Beauthier du département de Pharmacie, pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail, pour son soutien et les nombreux conseils fournis durant les expérimentations animales ;*

*tous les membres du Département de Pharmacie; le professeur J.-M. Dogné, le Docteur Lionel Pochet, Carine, Séverine, Ann-Marie, Philippe, et Piera pour les bons moments qu'ils m'ont fait passer au sein de leur équipe ;*

*le professeur A. Scozzafava et le docteur C.T. Supuran de l'Université de Florence qui m'ont accueillie au sein de leur laboratoire de Chimie Inorganique et Bioinorganique pour l'évaluation biologique ;*

*le professeur C. Michiels qui m'a permis de travailler au sein de son laboratoire et nous a fourni le type cellulaire utilisé au cours de ce mémoire;*

*Monsieur P. Drion de la commission d'éthique de l'Université de Liège pour sa participation à l'élaboration du protocole expérimental in vivo;*

*enfin, mes parents, mes frères et sœurs et amies pour tous les encouragements et le soutien qu'ils m'ont témoigné au cours de ces quatre années d'études et tendrement Sébastien, pour son soutien et ses réconforts.*



## **Evaluation pharmacologique d'indanesulfonamides en tant qu'inhibiteurs d'anhydrases carboniques**

FRANKART Aurélie

### Résumé

Seize isoformes d'anhydrase carbonique (AC) de type  $\alpha$  ont été découvertes chez les vertébrés supérieurs. Elles catalysent la réaction d'hydratation du dioxyde de carbone en bicarbonate et proton ( $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ ). Par cette réaction, elles régulent différentes fonctions physiologiques.

Quelques isoformes sont impliquées dans le cancer (AC IX et XII) et l'épilepsie (AC VII et AC XIV). Etant donné l'implication des anhydrases carboniques dans ces deux pathologies importantes en terme de santé publique, le Département de Pharmacie a entrepris la synthèse d'inhibiteurs sélectifs d'AC (iAC). Ces composés originaux présentent un groupement sulfonamide ( $\text{SO}_2\text{NH}_2$ ) capable d'interagir avec l'ion zincique présent dans le site catalytique de l'enzyme.

L'objectif de ce travail s'inscrit dans le cadre de l'évaluation pharmacologique de ces dérivés de l'indanesulfonamide en tant qu'inhibiteurs d'AC.

Dans un premier temps, une évaluation sur enzyme isolée nous a permis de déterminer le pouvoir inhibiteur de chacun des composés envers trois isoformes impliquées dans l'étiologie du cancer (AC XII) ou la physiopathologie des convulsions (AC VII et XIV). Plusieurs molécules se sont révélées très actives sur chacune des isoformes envisagées (AC XII, XIV et VII). Plusieurs relations structure-activité ont été mises en évidence et permettront la conception future de composés plus actifs et sélectifs.

Dans un second temps, nous avons évalué les effets biologiques de ces composés sur un modèle *in vitro* de cellules cancéreuses exprimant l'AC IX en membrane. Cette isoforme est impliquée entre autres dans l'acidification du milieu extratumoral. Cependant, ce test n'a pas permis de mettre en évidence une influence des iACs sur cette acidification du milieu.

Enfin, nous avons évalué les propriétés anticonvulsivantes de certains dérivés de l'indanesulfonamide dans un modèle de convulsions *in vivo* (Maximal electroshock seizure-test). La plupart de nos composés ont induit une très bonne protection des souris.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2006

**Promoteur :** Prof. B. Masereel

## Liste des principales abréviations

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
AC	Anhydrase carbonique
ACC	AcétylCoA Carboxylase
ADN	Acide déoxyribonucléique
Ag	Antigène
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
AZA	Acétazolamide
CCS	Carcinome de cellules rénales
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CPS	Carbamoyl Phosphate Synthétase
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
E	Enzyme libre
ES	Complexe enzyme-substrat
GABA	Acide gamma aminobutyrique
GOLD	<i>Genetic Optimisation for Ligand Docking</i>
HIF-1	<i>Hypoxia Inductible Factor-1</i>
HRE	<i>Hypoxia Responsive Element</i>
I	Inhibiteur
iAC	Inhibiteur d'anhydrase carbonique
IC	Queue intracellulaire
LCS	Liquide cérébrospinal
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney epithelial cells</i>
MDR	<i>Multi Drug Résistance</i>
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PC	Pyruvate Carboxylase
PDH	Prolyl 4-hydroxylase
PG	Région protéoglycanée
pH <sub>e</sub>	pH extracellulaire
pH <sub>i</sub>	pH intracellulaire
PIO	Pression intraoculaire
pVHL	Protéine suppressive de tumeur « von Hippel-Lindau »
RPTP	Récepteur de type tyrosine phosphatase
S	Substrat
SP	Peptide signal
TM	Domaine transmembranaire
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
ZNA	Zonisamide

# Table des matières

## Chapitre 1 : Introduction ..... 1

1.1. LES ANHYDRASES CARBONIQUES .....	1
1.1.1. Généralités .....	1
1.1.2. Mécanisme catalytique .....	2
1.1.3. Fonctions biologiques.....	3
1.1.3.1. Régulation acido-basique.....	3
1.1.3.2. Sécrétion de l'humeur aqueuse .....	5
1.1.3.3. Remaniement du tissu osseux .....	5
1.1.3.4. Rôle de l'AC au niveau cérébral.....	5
1.1.3.5. Implication dans le cancer .....	7
1.1.4. Les inhibiteurs d'anhydrase carbonique .....	8
1.2. CANCER ET ANHYDRASE CARBONIQUE DE TYPE IX ET XII .....	9
1.2.1. Le cancer .....	9
1.2.1.1. Description d'une cellule cancéreuse.....	9
1.2.1.2. Classification des tumeurs .....	10
1.2.1.3. Mécanismes de la cancérogenèse.....	10
1.2.1.4. Traitements .....	11
1.2.2. Anhydrase carbonique de type IX.....	14
1.2.2.1. Généralités.....	14
1.2.2.2. Distribution.....	14
1.2.2.3. Expression .....	15
1.2.3. Anhydrase carbonique de type XII .....	16
1.2.4. Impact de l'AC IX et XII dans le cancer .....	16
1.2.4.1. Réactions biosynthétiques .....	17
1.2.4.2. pH extracellulaire (pH <sub>e</sub> ).....	17
1.3. ANHYDRASE CARBONIQUE ET EPILEPSIE .....	19
1.3.1. L'épilepsie .....	19
1.3.2. Implication de l'AC dans l'épilepsie .....	20
1.3.3. Mécanismes d'action des médicaments antiépileptiques.....	20

## Chapitre 2 : Objectifs..... 22

## Chapitre 3 : Matériel et méthodes ..... 24

3.1. DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ INHIBITRICE D'INDANESULFONAMIDES .....	24
3.1.1. Généralités .....	24
3.1.2. Matériel .....	24
3.1.2.1. Préparation du tampon.....	24
3.1.2.2. Préparation des solutions stocks d'inhibiteur.....	24
3.1.2.3. Préparation de la solution enzymatique .....	25
3.1.2.4. Préparation des échantillons .....	25
3.1.2.5. Préparation de la solution substrat.....	25
3.1.3. Méthode .....	25
3.1.3.1. Appareil de type stopped flow .....	25
3.1.3.2. Détermination de l'IC <sub>50</sub> et du K <sub>i</sub> .....	26
3.2. CULTURE CELLULAIRE .....	27
3.2.1. Matériel .....	27
3.2.2. Méthode.....	27
3.2.3. Mesure du pH extracellulaire et de la viabilité cellulaire .....	28
3.2.3.1. Matériel .....	28
3.2.3.2. Méthode.....	28
3.3. MAXIMAL ELECTROSHOCK SEIZURE-TEST : MES-TEST .....	30





<b>Chapitre 4 : Résultats et discussions .....</b>	<b>31</b>
4.1. PRÉREQUIS .....	31
4.2. EVALUATION BIOLOGIQUE SUR ENZYMES ISOLÉES .....	32
4.2.1. <i>Test enzymatique</i> .....	32
4.2.2. <i>Résultats biologiques</i> .....	33
4.2.2.1. AC XII.....	33
4.2.2.2. AC XIV .....	34
4.2.2.3. AC VII.....	34
4.2.2.4. Conclusions .....	35
4.3. EVALUATION BIOLOGIQUE SUR UN MODÈLE IN VITRO .....	36
4.3.1. <i>Acidification du milieu extracellulaire et détermination de la viabilité cellulaire</i> .....	37
4.3.2. <i>Incubation avec un inhibiteur d'AC</i> .....	38
4.3.3. <i>Incubation over night avec un inhibiteur d'AC</i> .....	39
4.3.4. <i>Conclusions</i> .....	39
4.4. MAXIMAL ELECTROSHOCK SEIZURE : MES-TEST .....	41
 <b>Chapitre 5: Conclusions et perspectives.....</b>	 <b>43</b>
 <b>Chapitre 6 : Bibliographie.....</b>	 <b>47</b>



# **Chapitre 1: Introduction**



# Chapitre 1 : Introduction

## 1.1. Les anhydrases carboniques

(Chegwidden et al., 2000 ; Supuran<sup>b</sup> et al., 2004)

### 1.1.1. Généralités

Les anhydrases carboniques (ACs) définies comme des métalloenzymes ubiquitaires ont été découvertes il y a plus de 70 ans. Sur base de leur homologie de séquence, trois classes d'anhydrases carboniques sont repertoriées :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Les ACs de type  $\beta$  et  $\gamma$  se retrouvent principalement chez les bactéries et les plantes. L'anhydrase de type  $\alpha$  est la seule présente chez les vertébrés, mais elle est également détectée dans de nombreuses algues, plantes et dans quelques eubactéries (Chegwidden and Carter, 2000). Le site catalytique des ACs se caractérise par la présence d'un ion zincique coordonné à trois histidines et à une molécule d'eau (Christianson and Fierke, 1996 ; Stams and Christianson, 2000).

Les ACs sont capables de catalyser la réaction d'hydratation du dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) en acide carbonique ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) instable qui se dissocie rapidement en anion bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) et en proton ( $\text{H}^+$ ) (**Équation 1**).



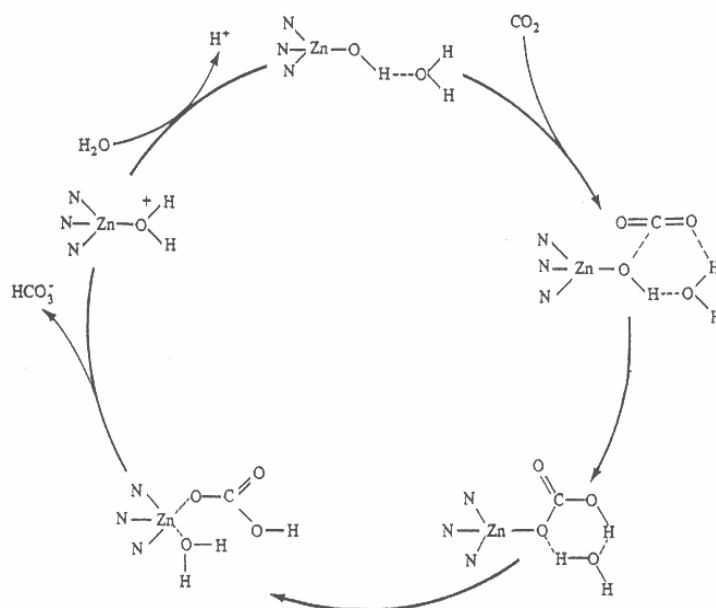
**Équation 1** : Réaction catalysée par les anhydrases carboniques.

Tant dans le règne végétal que dans le règne animal, les ACs régulent des fonctions biologiques vitales. Parmi celles-ci, on trouve chez les êtres humains : la respiration et le transport du dioxyde de carbone/bicarbonate entre les tissus et les poumons, la régulation de l'équilibre acido-basique, l'homéostasie du dioxyde de carbone, la sécrétion d'électrolytes, les réactions biosynthétiques (gluconéogenèse, lipogenèse et synthèse d'urée, ...), la résorption osseuse, les phénomènes de calcification (Supuran and Scozzafava, 2000 ; Supuran et al., 2003 ; Supuran<sup>a</sup> et al., 2004). Les ACs sont également impliquées dans divers mécanismes de cancérogenèse (Pastoreková and Pastorek, 2004).

**Tableau 1 :** Expression et localisation des anhydrases carboniques humaines de type  $\alpha$ .

Isoforme	Activité catalytique	Localisation sub-cellulaire	Expression dans les tissus
AC I	Faible	Cytosolique	Globules rouges, intestin
AC II	Haute	Cytosolique	Ubiquitaire
AC III	Très faible	Cytosolique	Tissus adipeux, muscle
AC IV	Haute	Transmembranaire	Rein, poumon, cerveau, intestin, endothélium
AC VA	Modérée à haute	Mitochondriale	Foie, muscle squelettique, rein
AC VB	Modérée à haute	Mitochondriale	Répandue (sauf foie)
AC VI	Modérée	Sécrétée dans la salive	Salive
AC VII	Haute	Cytosolique	Cerveau, glandes salivaires, poumon
CARP VIII	Nulle	Cytosolique	Cerveau, cellules de purkinje du cervelet
AC IX	Haute	Transmembranaire	Tumeurs et muqueuse gastrique
CARP X	Nulle	Cytosolique	Cerveau, placenta, glande pinéale
CARP XI	Nulle	Cytosolique	Cerveau
AC XII	Faible	Transmembranaire	Répandue Surtout colon, rein prostate
AC XIII	Modérée	Cytosolique	Glandes salivaires, rein, intestin, colon, utérus
AC XIV	Haute	Transmembranaire	Répandue, surtout rein et cœur

(Chegwidden and Carter, 2000 ; 2005 ; Supuran<sup>a</sup> et al., 2004).



**Figure 1 :** Représentation du mécanisme catalytique de l'hydratation du  $\text{CO}_2$  (Huheey et al., 1996).

Chez les vertébrés supérieurs, seize isoenzymes d'AC de type  $\alpha$  ont été découvertes. Elles se distinguent d'une part, par des localisations subcellulaires et tissulaires différentes et, d'autre part, par une variation de l'intensité de leur activité catalytique (hydratation du dioxyde de carbone) (**Tableau 1**). Ces ACs peuvent être cytoplasmiques (AC I, II, III, VII, XIII), mitochondriales (AC VA, VB), associée à la membrane (AC IV, IX, XII, XIV) ou sécrétées dans la salive (AC VI) (Pan et al., 2006). Une isoforme XV de l'AC fut récemment découverte (Hilvo et al., 2005). Elle correspond à la première AC de type  $\alpha$  non exprimée chez les humains et les chimpanzés. Elle est néanmoins détectée chez les rongeurs et semble avoir beaucoup de caractéristiques communes avec l'AC de type IV (Hilvo et al., 2005). D'autres isoformes particulières d'anhydrases carboniques appelées CARPs (*carbonic anhydrase related proteins*) sont présentes dans le cytosol et sont acatalytiques. Trois isoformes sont connues à ce jour : les CARPs VIII, X, XI (Tashian et al., 2000). La perte de leur activité serait attribuée à une substitution d'un ou de plusieurs résidus histidines présents dans le site, essentiels pour la liaison de l'ion zinc. Cet ion est indispensable à l'activité catalytique d'hydratation du dioxyde de carbone (Tashian et al., 2000). Il est difficile de déterminer la fonction cellulaire de ces isoformes acatalytiques conservées au cours de l'évolution. On observe une homologie de séquence de 89% à 94% entre les CARPs humaines et murines. Selon certaines études, ces isoenzymes interviendraient dans des interactions de type protéine-protéine (Nishimori, 2004). Elles pourraient également réguler des mécanismes de transcription ou de traduction (Tashian et al., 2000).

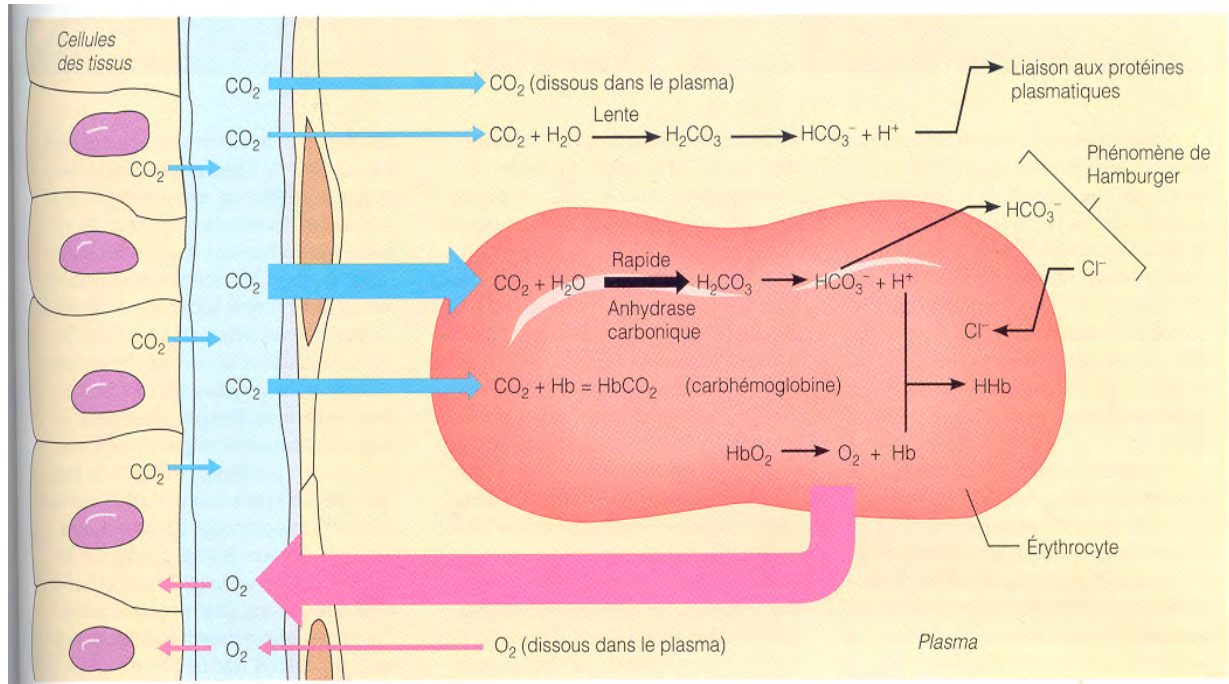
Notons que les ACs présentent une grande homologie de séquence avec différentes formes de récepteurs de type tyrosine phosphatase (RPTPs). Cependant ces récepteurs ne disposent pas d'activité catalytique de type anhydrase carbonique. Les RPTPs sont des protéines transmembranaires qui présentent des fonctions régulatrices (RPTP $\beta$ ) utilisées au cours du développement du système nerveux central, ou suppressives de tumeur (RPTP $\gamma$ ) (Barnea et al., 1993).

### 1.1.2. Mécanisme catalytique

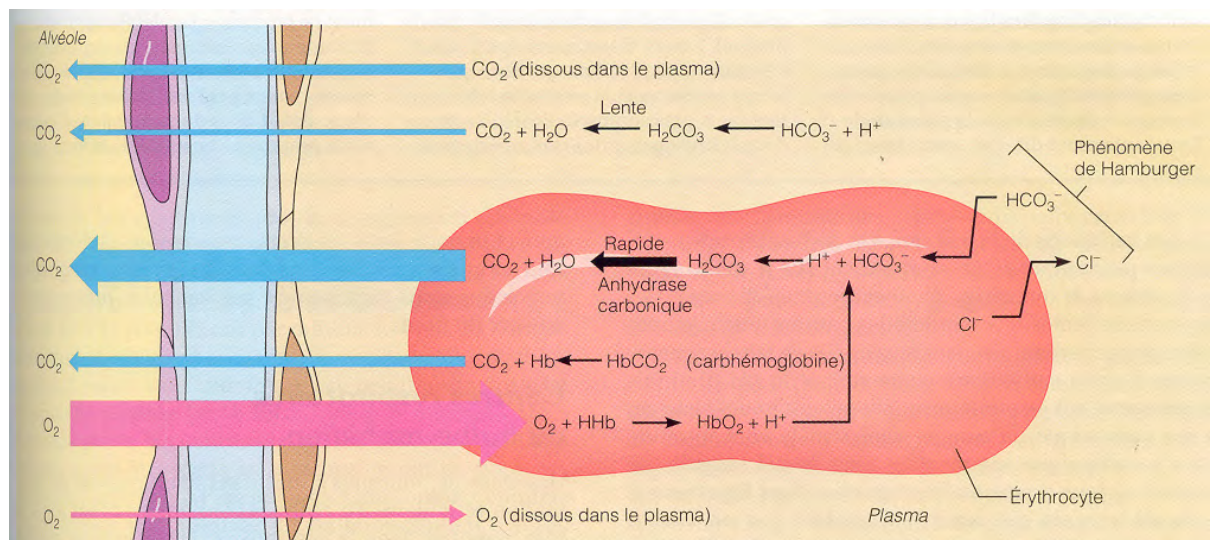
Les structures cristallines, déterminées pour six isoformes d'AC (AC I-IV et XII) montrent une homologie de structure et une conservation de l'architecture du site actif (Stams and Christianson, 2000). En effet, le site actif des ACs de type  $\alpha$  se caractérise par la présence d'un ion zincique coordonné à trois histidines et à une molécule d'eau ou un hydroxyle (Christianson and Fierke, 1996). Toutes les ACs  $\alpha$  actives, présentes chez les vertébrés catalysent le même mécanisme d'hydratation du CO<sub>2</sub>. Ce mécanisme est appelé : « mécanisme zinc-hydroxyde » (Lindskog, 1997) (**Figure 1**).

Au niveau du site actif, la présence de trois histidines rend l'ion zinc électro-négatif. La molécule d'eau liée est donc polarisée au point de libérer un proton pour former un ion hydroxyde coordonné au zinc (Huheey et al., 1996). Des ponts hydrogènes sont présents entre l'hydroxyle lié au zinc et le groupement hydroxyle d'un résidu thréonine 199<sup>1</sup>. Ce dernier forme alors une interaction par pont hydrogène avec un résidu glutamate 106<sup>1</sup>. Toutes ces liaisons par ponts hydrogène ont pour but d'augmenter la nucléophilie de l'eau et oriente le substrat (dioxyde de carbone) dans une position favorable aux attaques nucléophiles (Silverman and Lindskog, 1988 ; Stams and Christianson, 2000). Il y a alors attaque nucléophile du complexe Zinc-OH sur le dioxyde de carbone. L'ion bicarbonate est généré et se fixe au zinc. Celui-ci sera par la suite dissocié de l'ion métallique par l'intermédiaire d'une molécule d'eau (Christianson and Fierke, 1996 ; Silverman and Lindskog, 1988).

<sup>1</sup> La numérotation des acides aminés est réalisée sur base de celle de l'AC I.



**Figure 2:** Libération d'oxygène et absorption de gaz carbonique au niveau tissulaire (Marieb, 1999).



**Figure 3:** Absorption d'oxygène et libération de gaz carbonique au niveau pulmonaire (Marieb, 1999).



### 1.1.3. Fonctions biologiques

Par sa réaction catalytique d'hydratation du dioxyde de carbone en anion bicarbonate et proton (**Équation 1**), l'AC est impliquée dans un grand nombre de fonctions biologiques indispensables à la survie d'une multitude d'espèces. Dans cette partie, nous en décrirons quelques-unes, en mettant l'accent sur leur implication dans différentes pathologies.

#### 1.1.3.1. Régulation acido-basique (Marieb, 1999 ; Swenson, 2000)

La régulation acido-basique s'effectue aussi bien dans les poumons qu'au niveau rénal. Dans le système nerveux, l'AC participe à la perception et à la transduction du signal nécessaire au contrôle de la ventilation et au maintien d'une pression partielle en dioxyde de carbone. Dans les reins, l'AC est impliquée dans de nombreux processus qui modulent la résorption de l'ion bicarbonate et la sécrétion de proton afin de maintenir l'homéostasie acido-basique.

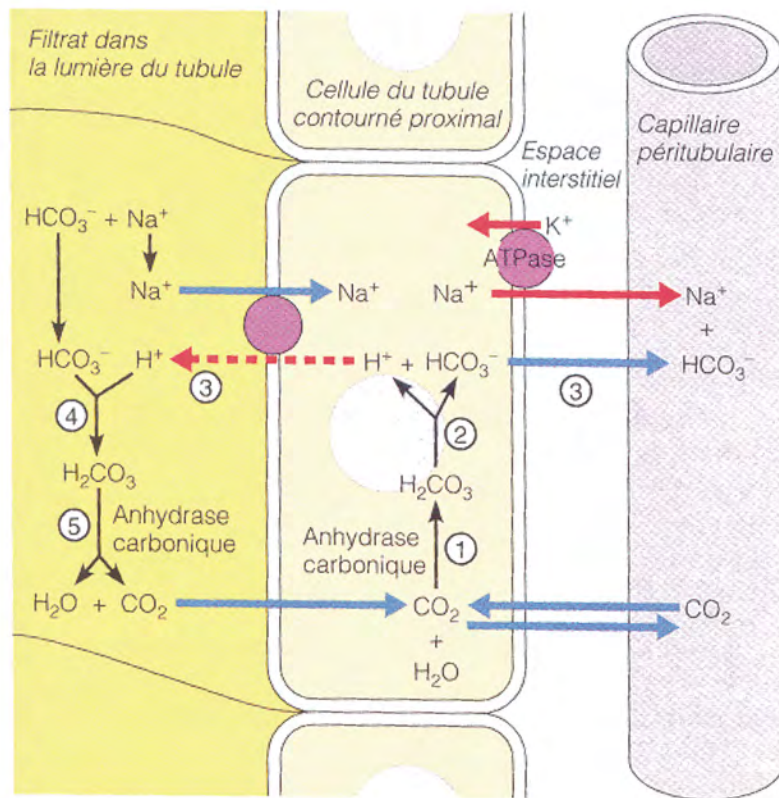
##### *a. Régulation au niveau de la respiration* (Marieb, 1999)

Les isoenzymes I, II et IV de l'AC sont impliquées dans la respiration (Maren, 1967 ; Swenson, 2000 ; Wistrand, 2000).

Le gaz carbonique présent dans le sang et les tissus est transporté sous trois formes distinctes. Ainsi 70% est véhiculé sous forme d'ion bicarbonate dans le plasma. Il peut être transporté aussi sous forme de complexe avec l'hémoglobine dans les érythrocytes (11%) pour former la carbhémoglobine. Enfin, un faible pourcentage de dioxyde de carbone sera simplement dissout dans le plasma (Marieb, 1999) (**Figure 2**).

Le dioxyde de carbone se combine à l'eau et forme de l'acide carbonique instable, qui se dissocie rapidement en proton et en ion bicarbonate. Cette interconversion se déroule aussi bien dans le plasma que dans les érythrocytes. Cependant, elle est beaucoup plus rapide dans les érythrocytes étant donné la présence d'anhydrase carbonique capable de catalyser cette réaction. Les protons qui sont libérés par la dissociation de l'acide carbonique, abaissent le pH du cytoplasme des globules rouges et diminuent l'affinité de l'oxygène pour l'hémoglobine, permettant ainsi d'augmenter la libération de l'oxygène. Ce phénomène est plus communément défini comme l'effet Bohr. Les protons libérés influencent peu le pH sanguin, celui-ci devient à peine plus acide. En effet, cette sous-unité acide est rapidement captée par l'hémoglobine qui présente un effet tampon. Une fois produit, les ions bicarbonates diffusent rapidement des érythrocytes vers le plasma qui les transportent aux poumons. Pour compenser l'efflux soudain d'ion bicarbonate, des ions chlorures passent du plasma aux érythrocytes. Cet échange ionique est appelé phénomène Hamburger.

Au niveau des poumons, le processus est inversé pour permettre la diffusion du gaz carbonique contenu dans le sang vers les alvéoles pulmonaires. La **Figure 3** illustre tous ces échanges.



**Légende :**

- = Transport actif primaire
- = Transport passif (diffusior)
- - - → = Transport actif secondaire
- = Transporteur protéique

**Figure 4 :** Régulation acido-basique au niveau rénal (Marieb, 1999). 1 : Réaction catalysée par l'anhydrase carbonique. 2 : Dissociation de l'acide carbonique ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) en ions bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) et proton ( $\text{H}^+$ ). 3 : Sécrétion d'un ion  $\text{H}^+$  dans le filtrat et réabsorption d'un ion  $\text{HCO}_3^-$ . 4 : Liaison du  $\text{H}^+$  sécrété avec l'anion  $\text{HCO}_3^-$  présent dans le filtrat tubulaire. 5 : Dissociation de l'acide carbonique formé dans le filtrat et libération du gaz carbonique et de la molécule d'eau.

**b. Régulation au niveau rénal** (Marieb, 1999)

Trois isoenzymes d'AC semblent intervenir dans la régulation acido-basique au niveau des reins : AC II, IV, V (Maren, 1967 ; Swenson, 2000).

Les tampons sanguins (acide carbonique/bicarbonate, phosphate disodique/phosphate monosodique, ...) neutralisent temporairement les bases et acides en excès sans pouvoir les éliminer de l'organisme. Si les poumons évacuent l'acide carbonique en éliminant le gaz carbonique et l'eau, seuls les reins peuvent débarrasser l'organisme des autres acides engendrés par le métabolisme cellulaire : acide urique, acide lactique, ... (Marieb, 1999).

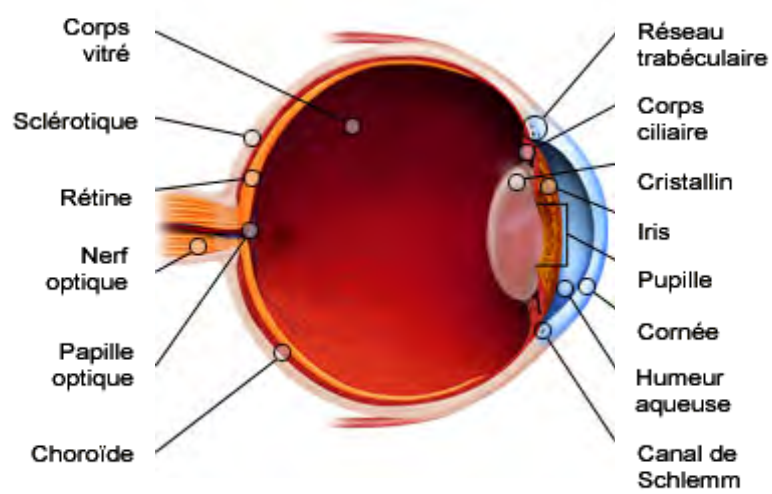
La **Figure 4** illustre divers échanges au niveau des cellules rénales. Pour chaque proton excrété dans la lumière du tubule, un ion  $\text{Na}^+$  est réabsorbé à partir du filtrat. L'équilibre électrochimique est ainsi maintenu de part et d'autre de la paroi des tubules. Les protons excrétés proviennent de l'activité catalytique de l'AC présente au niveau des cellules tubulaires. Notons aussi que les protons excrétés dans le filtrat peuvent se combiner aux ions bicarbonates présents à cet endroit et produire du gaz carbonique et de l'eau. Le dioxyde de carbone entre par diffusion passive dans les cellules tubulaires, où il est converti en anions bicarbonate par l'AC. L'acide carbonique constitue le principal tampon inorganique du sang (tampon acide carbonique/bicarbonate). Pour cette raison, les réserves sanguines de cet ion bicarbonate doivent rapidement être reconstituées. Les cellules tubulaires étant presque complètement imperméables aux ions bicarbonates présents dans le filtrat, elles ne peuvent donc pas les récupérer directement. Cependant, la dissociation de l'acide carbonique dans les cellules tubulaires libère des ions bicarbonates qui peuvent être réabsorbés vers le sang des capillaires péri-tubulaires. Le passage de ces ions est couplé avec celui des  $\text{Na}^+$  préalablement réabsorbés du filtrat. Lorsque de grandes quantités de protons sont sécrétées dans le filtrat, des quantités équivalentes d'anions bicarbonates entrent dans le sang péri-tubulaire.

**c. Déséquilibre acido-basique** (Marieb, 1999)

Un déséquilibre acido-basique survient à la suite du fonctionnement inefficace d'un des systèmes tampons physiologiques. Ainsi dans le système respiratoire, on observe un déséquilibre acido-basique qui se traduit par une acidose ou une alcalose respiratoire. On se trouve en présence d'une acidose respiratoire lorsque la respiration devient superficielle ou lorsque les échanges gazeux dans les alvéoles sont entravés (fibrose kystique, pneumonie, etc). Le dioxyde de carbone s'accumule alors dans le sang où il est transformé en acide carbonique et en protons. L'alcalose respiratoire quant à elle, s'établit lorsque le gaz carbonique est éliminé plus rapidement qu'il n'est produit.

Le système respiratoire cherche à compenser les déséquilibres métaboliques, tandis que les reins tentent de corriger les déséquilibres causés par une affection respiratoire. En règle générale, la fréquence et l'amplitude respiratoires changent lorsque le système respiratoire tente de compenser les déséquilibres acido-basiques métaboliques. En cas d'acidose métabolique, la fréquence et l'amplitude respiratoire sont augmentées, ce qui indique qu'une forte concentration de protons stimule les centres respiratoires. Il existe différentes causes d'acidoses métaboliques telles que l'ingestion excessive d'alcool, une maladie rénale ou l'incapacité des reins à éliminer les acides formés par les processus métaboliques.

D'un point de vue thérapeutique, l'utilisation d'inhibiteurs d'AC (iAC) induit une acidose métabolique (Marieb, 1999) et par conséquent une hyperventilation. Celle-ci est recherchée dans le traitement du mal de l'altitude (Cain and Dunn, 1966) ou pour diminuer les syndromes d'apnée du sommeil.



**Figure 5 :** Structure interne de l'œil.

### 1.1.3.2. Sécrétion de l'humeur aqueuse (Maren, 2000 ; Wistrand, 2000)

Le glaucome est une maladie chronique dégénérative de l'œil qui peut mener à une perte partielle ou totale de la vue. Cette pathologie se caractérise par une augmentation de la pression intraoculaire (PIO), engendrant des dommages irréversibles au niveau du nerf optique ou de la rétine. Un mauvais fonctionnement de l'AC peut être à l'origine de cette hypertension oculaire. En effet, deux isoenzymes d'ACs sont exprimées dans l'épithélium non pigmenté du corps ciliaire. L'AC de type II se retrouve au niveau du cytosol, tandis que l'AC IV est principalement exprimée au niveau de la membrane (Maren, 2000). Ces deux isoformes forment une grande quantité d'anions bicarbonates qui favorise le transport du sodium. Ce dernier permet un mouvement de fluides par effet osmotique et par conséquent, la formation de l'humeur aqueuse dans la chambre antérieure de l'œil. Au niveau de cette chambre, l'humeur traverse la pupille et pénètre dans la chambre postérieure. Dans un œil sain, la quantité d'humeur aqueuse produite est égale à la quantité de liquide évacuée par l'intermédiaire du réseau trabéculaire et du canal de Schlemm (**Figure 5**). Cet équilibre maintient la pression intraoculaire à une valeur normale de 12-22 mmHg. Si le drainage de l'humeur aqueuse est entravé, la pression intraoculaire augmente et peut endommager le nerf optique.

Parmi l'arsenal de médicaments utilisés pour traiter le glaucome, on peut citer les inhibiteurs d'AC. Ils permettent de diminuer la sécrétion d'anions bicarbonates et par conséquent, celle de l'humeur aqueuse. L'utilisation de tels inhibiteurs réduit de 25-30 % la PIO (Maren, 1967 ; Maren et al., 1992).

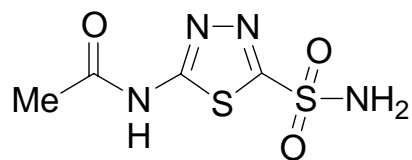
Une meilleure connaissance des mécanismes physiologiques responsables de cette pathologie permet d'investiguer de nouveaux traitements. En effet, l'AC II et IV représentent les deux isoenzymes principales impliquées dans l'augmentation de la PIO. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques contre l'AC II et IV permettrait ainsi d'augmenter l'efficacité du traitement. Cependant aucun inhibiteur de ce type n'est actuellement présent sur le marché, seuls des iACs non spécifiques existent. Etant donné que les ACs sont également exprimées dans une multitude d'autres types cellulaires, l'utilisation d'iACs systémiques engendrent de nombreux effets indésirables. Par conséquent, dans le traitement du glaucome, l'administration d'iACs en collyre permet une inhibition des ACs localement et diminue ainsi l'apparition des effets secondaires (Mincione et al., 2004).

### 1.1.3.3. Remaniement du tissu osseux (Hentunen et al., 2000)

L'anhydrase carbonique intervient dans le remaniement du tissu osseux qui comprend : la calcification, la résorption osseuse ainsi que la différenciation des ostéoclastes.

#### *a. Le processus de calcification*

L'AC joue un rôle dans la calcification physiologique ou pathologique du cartilage de mammifère. Ces enzymes agissent au travers d'une modification du pH qui favorise la précipitation de phosphate de calcium. L'AC II est la seule isoenzyme impliquée dans ce processus (Kumpulainen and Vaananen, 1982).



**Figure 6 :** Structure de l'acétazolamide, un inhibiteur d'anhydrase carbonique.

**Tableau 2 :** Distribution des diverses isoformes d'AC au niveau de l'encéphale.

<i>Expression dans les types cellulaires</i>	<i>Isoformes</i>
Cellules épithéliales du plexus choroïdien	II, III, XII, CARP VIII, CARP XI
Cellules endothéliales des vaisseaux sanguins	IV
Astrocytes	V, CARP XI
Gaine de myéline	CARP X
Oligodendrocytes	II
Neurones	V, XIV, CARP XI

### ***b. La résorption osseuse***

Minkin et Jennings ont mis en évidence pour la première fois en 1972 l'implication de l'anhydrase carbonique dans le phénomène de résorption osseuse. En effet, le tissu osseux est très actif et dynamique, il est en remaniement perpétuel (Marieb, 1999). Les ostéoblastes et ostéoclastes participent activement dans les processus de dépôt et de résorption de la matière osseuse.

Les ostéoclastes s'accrochent au tissu osseux et sécrètent différentes enzymes qui digèrent la matrice osseuse. Les sels de calcium (hydroxyapatite) qui confèrent la rigidité de l'os sont ainsi solubilisés. Les ostéoclastes participent également à la sécrétion d' $H^+$  et d'ion chlorure (Vaananen et al., 1990). L'espace formé entre le tissu osseux et les ostéoclastes est rendu acide et permet la dissolution de la matrice osseuse. Les protons sécrétés par les ostéoclastes proviennent de l'hydratation du dioxyde de carbone catalysée majoritairement par l'AC cytosolique de type II. La sécrétion de protons est rendue possible par l'intermédiaire de pompes à protons ATP-dépendantes (Sundquist et al., 1990). Les ostéoclastes contiennent d'ailleurs une grande quantité de mitochondries nécessaires à la production d'ATP.

De nombreuses études menées sur la résorption osseuse indiquent que l'inhibition d'AC diminue de façon significative cette digestion de la matrice osseuse (Laitala and Vaananen, 1994) et dès lors des iACs pourraient être utilisés dans des troubles métaboliques osseux comme l'ostéoporose.

### ***c. La différenciation des ostéoclastes***

Beaucoup de données suggèrent l'intervention de l'AC II dans le phénomène de différenciation et de maturation des ostéoclastes. L'utilisation d'iAC comme l'acétazolamide (**Figure 6**) (Lehenkari et al., 1998) ou l'introduction d'ARN ou d'ADN antisens ciblant l'AC II (Laitala and Vaananen, 1994 ; Laitala-Leinonen et al., 1999), ont permis de mettre en évidence l'absence de différenciation des ostéoclastes. Cependant, le mécanisme exact joué par l'AC II n'est pas encore connu.

#### **1.1.3.4. Rôle de l'AC au niveau cérébral** (Cammer and Brion, 2000 ; Thiry<sup>a</sup> et al., 2006)

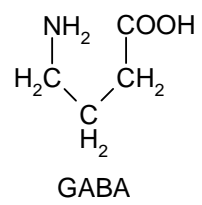
Au niveau du système nerveux, les ACs sont localisées dans divers types cellulaires où elles exercent un nombre impressionnant de fonctions (Cammer and Brion, 2000).

Pendant longtemps, l'AC II fut considérée comme la seule AC exprimée au niveau cérébral. Récemment, d'autres isoenzymes de l'AC furent découvertes dans l'encéphale et pour chacune d'entre-elles, on retrouve une localisation précise en fonction de leur rôle physiologique (Thiry<sup>a</sup> et al., 2006) (**Tableau 2**).

Les fonctions physiologiques jouées par les ACs au niveau cérébral sont détaillées ci-dessous :

#### ***a. Mouvements des fluides et d'ions***

L'AC accélère la conversion du gaz carbonique en ion bicarbonate et proton. Ceux-ci intervenant dans de nombreux mécanismes de transport ionique dont l'antiport  $Cl^-/HCO_3^-$  et  $Na^+/H^+$ . Des mouvements de fluides accompagnent ces flux d'ions par un processus osmotique (Cammer and Brion, 2000). Ce mouvement de fluide joue un rôle important dans la formation du liquide cébrospinal (LCS). Les cellules épithéliales du plexus choroïdien sécrètent le LCS par un procédé qui met en jeu le transport d'ions  $Na^+/Cl^-/HCO_3^-$  du sang vers le cerveau. Ce mouvement d'ions permet de véhiculer les liquides par un flux osmotique.



**Figure 7 :** Structure de l'acide gamma aminobutyrique (GABA).



**b. Régulation et la modulation du pH**

Une faible modulation de pH interne affecte les nombreux canaux ioniques et par conséquent les fonctions neuronales. En effet, une modification de pH peut donner lieu à des phénomènes excitatoires (Thiry<sup>a</sup> et al., 2006). Un pH alcalin a une action positive sur l'excitabilité tandis qu'un pH acide a un effet inverse. Le système tampon  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  fournit par l'AC permet de réguler les variations de pH extra ou intracellulaire (Thiry<sup>a</sup> et al., 2006).

**c. Régulation du signal GABAergique**

L'acide gamma aminobutyrique (GABA, **Figure 7**) est le principal neurotransmetteur inhibiteur de l'encéphale. Celui-ci va s'associer à son récepteur couplé à un canal ionique ligand dépendant. L'activation du récepteur conduit à une accumulation intraneuronale d'ion  $\text{Cl}^-$ . Cependant, la transmission du signal GABAergique n'est pas toujours inhibitrice. Dans certaines circonstances elle peut être excitatrice. Ce mécanisme d'excitation comporte à la fois un efflux d'ions bicarbonates au travers du récepteur GABA et une augmentation de la concentration intracellulaire en potassium par l'intermédiaire de pompes ioniques. L'AC VII assure l'approvisionnement des anions bicarbonates (Thiry<sup>a</sup> et al., 2006).

**d. Réactions biosynthétiques**

De nombreuses réactions biosynthétiques utilisant une étape de carboxylation préalable, tels que la gluconéogenèse et la lipogenèse. Elles utilisent comme substrat l'ion bicarbonate. L'anhydrase carbonique en assure le ravitaillement (Chegwidden et al., 2000).

**e. Phénomènes de prolifération et de différenciation**

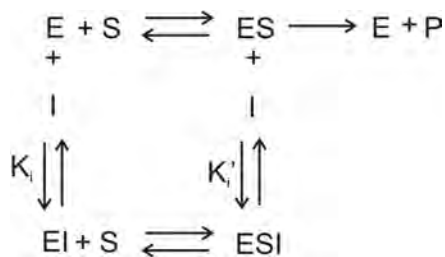
La fonction exacte des CARP<sub>s</sub> au niveau de l'encéphale est incertaine. Certaines études suggèrent que celles-ci interviendraient lors du développement dans la prolifération et la différenciation des neurones (Taniuchi et al., 2002).

**f. Etiologie des convulsions**

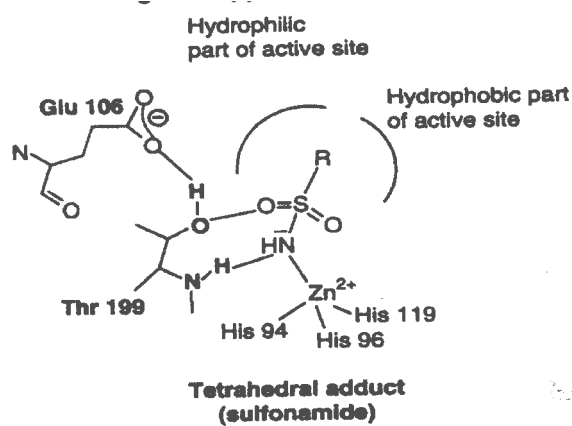
L'acétazolamide, un iAC, est largement utilisé depuis plusieurs dizaines d'années en clinique pour ses propriétés anticonvulsantes (Maren, 1967). Cependant, son utilisation conduit à l'apparition de phénomène de tolérance et il ne peut être utilisé à long terme (Cammer and Brion, 2000). L'implication de l'AC dans l'étiologie des convulsions sera plus amplement détaillée dans la section 1.3.

**1.1.3.5. Implication dans le cancer**

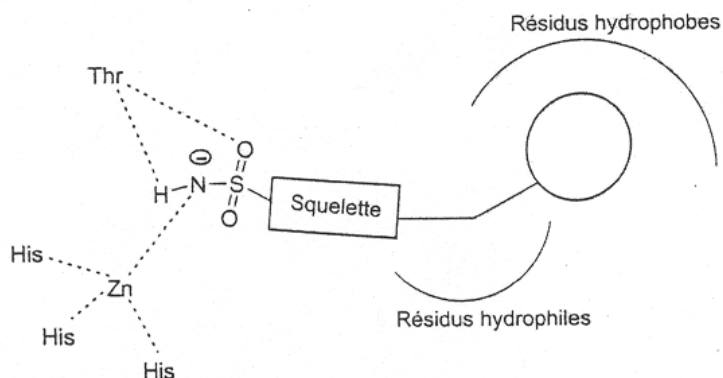
Deux isoenzymes de l'AC sont impliquées dans le cancer : l'AC IX et XII. L'AC IX est exprimée dans les tissus tumoraux tandis que dans les tissus sains son expression est limitée (Zavada et al., 1993). L'AC XII est présente dans de nombreux tissus sains et est surexprimée dans le carcinome des cellules rénales (Tureci et al., 1998). L'implication de ces deux isoformes sera abordée ultérieurement dans la partie 1.2.2.



**Figure 8 :** Equation cinétique montrant la fixation de l'I à E et à ES dans une inhibition non compétitive.



**Figure 9 :** Mécanisme d'inhibition des ACs par les sulfonamides. (Supuran<sup>a</sup> et al., 2004).



**Figure 10 :** Schéma général d'un inhibiteur d'AC au sein du site actif enzymatique.

### 1.1.4. Les inhibiteurs d'anhydrase carbonique

Peu après la découverte de l'anhydrase carbonique, Mann et Keilin en 1940 montrèrent que certains sulfonamides étaient capables d'inhiber de façon spécifique cette enzyme. Depuis lors, de nombreux sulfonamides ont été synthétisés et évalués (Maren, 1967) en tant qu'inhibiteurs d'AC afin de traiter ou de prévenir une multitude de maladies. Ils sont essentiellement utilisés en tant qu'anticonvulsants et dans le traitement du glaucome. Les iACs sont régulièrement utilisés pour le traitement du mal de l'altitude. En effet, ils exercent une action vasodilatatrice au niveau cérébral et ils participent à la modulation de la respiration en agissant au niveau du centre respiratoire. Ils sont également fréquemment utilisés en tant qu'agents diurétiques (Mansoor et al., 2000).

Les inhibiteurs d'anhydrase carbonique se divisent en deux grandes classes : les anions et les sulfonamides. Malgré leurs différences structurales, ils inhibent tous les deux l'AC selon une cinétique purement non compétitive et réversible (Ilies et al., 2004).

Les inhibiteurs réversibles interagissent avec l'enzyme sans former de liaison covalente avec celui-ci. L'inhibition non compétitive se définit par le fait que l'inhibiteur peut se lier soit à l'enzyme libre (E), soit au complexe enzyme-substrat (ES) ( $K_i = K_i'$ ) (**Figure 8**). Cependant, l'inhibiteur (I) et le substrat (S) n'entrent pas en compétition pour se fixer sur un même site : le substrat se lie au niveau du site actif alors que l'inhibiteur se lie sur un autre site de fixation. L'inhibiteur entraîne ainsi une modification de la conformation du site actif et empêche la transformation du substrat en produit. Il n'influe pas sur la reconnaissance entre l'enzyme et le substrat (Garrett and Grisham, 2000). Une inhibition non compétitive ne peut pas être levée par une augmentation de la concentration en substrat, puisque l'inhibiteur se lie aussi bien sur l'enzyme libre que sur le complexe enzyme substrat (Garrett and Grisham, 2000).

Les sulfonamides exercent leur action inhibitrice en se liant au zinc présent dans le site actif, par exclusion d'une molécule d'eau. Ils se lient sous forme déprotonée et forme un complexe de coordination à géométrie tétraédrique (Supuran<sup>a</sup> et al., 2004) (**Figure 9**). L'inhibiteur est maintenu en place dans son site actif par l'intermédiaire de ponts hydrogène réalisés avec les résidus thréonine 199<sup>1</sup> et glutamate 106<sup>1</sup>. La chaîne latérale substituée sur un squelette aromatique ou hétérocyclique de l'inhibiteur interagit avec les acides aminés hydrophobes et hydrophiles situés au niveau du site actif à proximité du zinc (**Figure 10**).

Il existe une grande homologie de séquence entre les diverses isoenzymes. Le haut degré de similarité entre les différentes isoenzymes d'ACs rend difficile la conception d'inhibiteur hautement spécifique.

<sup>1</sup> La numérotation des acides aminés est réalisée sur base de celle de l'AC I.



## **1.2. Cancer et anhydrase carbonique de type IX et XII**

### **1.2.1. Le cancer**

#### 1.2.1.1. Description d'une cellule cancéreuse (Scotta et al., 2002)

La cellule cancéreuse possède de nombreuses caractéristiques typiques permettant de la différencier d'une cellule normale.

##### ***a. La clonalité***

Un tissu cancéreux est souvent considéré comme un clone, car toutes les cellules qui le constituent descendent d'une ou plusieurs cellules souches. Une tumeur se développant à partir d'un groupe de cellules est dite polyclonale. Par contre, si elle se développe à partir de quelques cellules, la tumeur est oligoclonale. Une tumeur maligne est monoclonale et descend d'une seule cellule. Bien que certaines tumeurs bénignes ou même certaines lésions non tumorales soient également monoclonales, la monoclonalité peut être un critère important de malignité.

##### ***b. Similarité avec les cellules embryonnaires***

Les cellules tumorales échappent aux systèmes de régulation de l'organisme et se comportent ainsi comme des cellules embryonnaires. Elles sont partiellement ou totalement incapables de transformations morphologiques et fonctionnelles. Par conséquent, elles ne peuvent pas se différencier ni se spécialiser en une cellule mature d'un type cellulaire particulier. Plus une cellule cancéreuse est anaplasique (indifférenciée) et plus elle est considérée comme maligne.

##### ***c. Anomalies morphologiques***

L'appréciation des anomalies morphologiques cellulaires constitue un critère majeur du diagnostic des cancers. Ces anomalies ne sont que la conséquence phénotypique de multiples mutations moléculaires au niveau des molécules d'adhérence, du cytosquelette, des organites intracellulaires, de la chromatine, ...

On peut citer quelques caractéristiques cytologiques de malignité telles que :

- l'augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique par accroissement de la taille du noyau
- l'anisocaryose
- la répartition anormale de la chromatine
- l'irrégularité des contours nucléaires
- l'augmentation du nombre de mitoses avec la présence de mitoses anormales
- l'anisocytose
- l'aspect basophile du cytoplasme

Cependant, il est important de remarquer que des cellules non cancéreuses, réactionnelles peuvent présenter des anomalies identiques au cours de processus inflammatoires ou après irradiation. De plus, ces caractères morphologiques ne sont pas constants : une cellule cancéreuse peut avoir une morphologie tout à fait normale.

**Tableau 3** : Principales caractéristiques des tumeurs bénignes et malignes.

<i><b>Tumeurs bénignes</b></i>	<i><b>Tumeurs malignes</b></i>
Bien délimitée	Mal délimitée
Encapsulée	Non encapsulée
Histologiquement semblable aux tissus d'origine	Plus ou moins semblable au tissu d'origine (dédifférenciation, différenciation aberrante)
Cellules régulières	Cellules irrégulières
Croissance lente	Croissance rapide
Refoulement sans destruction des tissus voisins	Envahissement des tissus voisins
Pas de récurrence locale après exérèse complète	Récurrence possible après exérèse supposée totale
Pas de métastases	Métastases

***d. Anomalies génétiques***

L'hypothèse selon laquelle le cancer aurait pour origine des anomalies du matériel génétique a été formulée très tôt. Celles-ci correspondent à un remaniement numérique (monosomie, trisomie,...), ou structural (translocation,...), soit à une anomalie de la ploïdie ou une amplification génique.

***e. Anomalies de la croissance et de la prolifération***

Au niveau membranaire, la capacité de prolifération de la cellule cancéreuse est déterminée par des modifications qualitatives et quantitatives au niveau des antigènes de la membrane cytoplasmique. Ainsi, la prolifération de la cellule cancéreuse n'est plus régulée par l'organisme et devient autonome, progressive et irréversible.

Parmi les anomalies de croissance et de prolifération on trouve :

- l'immortalité : alors que les cellules tumorales en culture survivent indéfiniment, les cellules normales en culture ne se divisent qu'un certain nombre de fois. A l'issue de ces divisions, elle meurt par apoptose
- la perte de l'inhibition de contact
- l'indépendance des cellules tumorales vis-à-vis des facteurs de croissance
- la cohésion des cellules tumorales entre elles est diminuée, suite à des anomalies de régulation des molécules d'adhérence

***f. Différenciation des tumeurs bénignes et malignes.***

Il est important de bien différencier ces deux termes. Divers critères de distinction sont régulièrement utilisés (**Tableau 3**).

**1.2.1.2. Classification des tumeurs** (Scotta et al., 2002)

Les différentes tumeurs sont généralement classées en fonction du tissu d'origine à partir duquel elles se sont développées. On parle de **sarcome** si la tumeur se développe à partir d'un tissu mésenchymateux, tel que le tissu osseux, cartilagineux, adipeux ou musculaire. Les **carcinomes** correspondent à la forme la plus courante des cancers. Ils dérivent des tissus épithéliaux de revêtement (carcinome épidermoïde ou épithéliome) ou des tissus glandulaires (adénocarcinome). Les **leucémies ou lymphomes** se développent à partir des cellules sanguines.

**1.2.1.3. Mécanismes de la cancérogenèse** (Marieb, 1999)

Alors que la plupart des maladies proviennent de l'atteinte de plusieurs cellules, le cancer est le résultat de la transformation d'une seule cellule.

Le mécanisme intime du cancer est génétique. Deux sortes de gènes, les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur ont un rôle fondamental dans l'apparition du cancer. Ces deux gènes contrôlent la division et le développement cellulaire.

Les proto-oncogènes stimulent la croissance tandis que les gènes suppresseurs de tumeur l'inhibent. Ces deux gènes peuvent être mutés ce qui engendre une prolifération cellulaire anarchique, à l'origine des cancers.





Les proto-oncogènes mutés deviennent des oncogènes qui stimulent la synthèse de diverses protéines. Celles-ci sont soit des facteurs de croissance stimulant la prolifération des cellules, soit des protéines indispensables aux facteurs de croissance.

Les gènes suppresseurs de tumeur codent pour des protéines qui inhibent la division cellulaire. Des mutations à l'intérieur de ces gènes peuvent inactiver ces protéines et aboutir à une multiplication cellulaire incontrôlable.

Il existe un équilibre complexe entre ces deux types de gènes. La transformation cancéreuse vient d'une rupture de l'équilibre par une augmentation de l'activité d'un oncogène ou par une diminution de l'activité d'un anti-oncogène. Ce déséquilibre peut résulter d'une mutation provoquée par un agent extérieur ou un facteur favorisant. Il existe un certain nombre de facteurs favorisant le développement d'un cancer comme les facteurs biologiques tels que l'hérédité, certains virus, une déficience du système immunitaire, les facteurs physiques comme le rayonnement ionisant, les facteurs chimiques et les facteurs environnementaux.

#### 1.2.1.4. Traitements (Scotta et al., 2002)

L'efficacité d'un traitement pour combattre le cancer dépend à la fois du type de cancer, des caractéristiques spécifiques de la tumeur, de la rapidité de son évolution, de l'ampleur de sa division, ... Les traitements traditionnels du cancer incluent la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie qui peuvent être employées seules ou plus régulièrement en combinaison. Une meilleure connaissance des mécanismes spécifiques aux cellules cancéreuses permet aux scientifiques d'envisager des nouvelles perspectives thérapeutiques.

##### ***a. Approche chirurgicale***

La principale approche du traitement du cancer consiste à retirer chirurgicalement la tumeur. Autrefois, cela impliquait également l'ablation de tous les tissus et organes qui risquaient d'être atteints, y compris les tissus adjacents et les ganglions de la région. Les progrès des techniques chirurgicales et l'anesthésie, la disponibilité des produits sanguins et l'utilisation d'antibiotiques plus puissants ont permis de réduire l'ampleur des interventions. Malheureusement, de nombreux cancers sont découverts à des stades trop avancés pour être opérables. C'est le cas lorsque l'extension atteint des organes vitaux ou que les métastases sont déjà apparues. Dans ce cas, on utilise la chirurgie afin de diminuer les symptômes, de réduire la taille de la tumeur et de faciliter l'action des autres traitements. La chirurgie est aussi un outil de diagnostic précis afin de déterminer le type de cancer (biopsie). Parfois, elle peut être utilisée pour assurer une reconstitution après un traitement (chirurgie réparatrice), ou pour soulager le patient et lui assurer des conditions optimales de fin de vie (chirurgie palliative).

##### ***b. La radiothérapie***

Dès la découverte de la radioactivité en 1895 par Becquerel et Curie, le traitement des tumeurs par exposition des cellules cancéreuses aux radiations ionisantes, a été envisagé. Ces rayonnements attaquent préférentiellement les cellules qui se multiplient rapidement et sont nocifs en raison de leur effet sur l'ADN. On peut citer l'exemple de la boroneutronthérapie (Winum et al., 2005). Cette technique consiste à administrer à un malade des dérivés du bore. L'isotope 10 du bore a la particularité d'absorber des neutrons et de se transformer en lithium avec une émission de particules  $\alpha$  (He) et une énergie de 2,4 MeV. Ces dérivés doivent avoir la plus grande affinité possible pour les tissus néoplasiques. Ces composés boriques sont ensuite bombardés par des neutrons.

**Tableau 4 :** Mode d'action de divers agents chimiothérapeutiques.

	<i>Modes d'action</i>	<i>Exemples</i>
Agents alkylants	Défaut de réplication de l'ADN	melphalan, chlorambucil, cyclophosphamide, muphoran, carboplatine,...
Intercalants	Inhibition de la réplication et de la transcription de l'ADN	doxorubicine, daunorubicine et mitoxantrone, ...
Inhibiteurs de topoisomérases I et II	Inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN en modifiant le superenroulement de l'ADN	topotecan, irinotecan, etoposide, teniposide, doxorubicine, daunorubicine, ...
Antimétabolites	Inhibition d'une ou plusieurs étapes de la synthèse des acides nucléiques	méthotrexate, fludarabine, cladribine, fluorouracil ...
Agents tubulo-affines ou alcaloïdes végétaux	Interfèrent avec la synthèse des microtubules et la formation du fuseau mitotique	paclitaxel, vinblastine, ...

Les atomes de bore sans action par eux-mêmes captent les neutrons et émettent des particules  $\alpha$  ( $\text{He}^{2+}$ ) et du  $\text{Li}^{3+}$  qui lèsent les tissus. La difficulté de cette technique est d'une part de synthétiser des molécules à base de bore ayant une affinité élevée pour les tissus néoplasiques et d'autre part de disposer d'une source de production de neutrons. Plusieurs molécules contenant des atomes de bore sont actuellement en cours d'expérimentation.

### *c. La chimiothérapie*

La chimiothérapie consiste à traiter le cancer par l'utilisation de substances chimiques. Les médicaments sont véhiculés dans tout l'organisme par l'intermédiaire de la circulation sanguine. Les molécules anticancéreuses sont classées par famille selon leur mécanisme d'action (**Tableau 4**). Elles ciblent les différents facteurs de la division cellulaire et de la réplication de l'ADN : la molécule d'ADN elle-même (agents alkylants), les enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN (inhibiteurs des topoisomérase I et II), les nucléotides (antimétabolites), ou les microtubules du fuseau mitotique (Schorderet and collaborateurs, 1998).

Les agents alkylants induisent des lésions à l'ADN. Ces composés organiques électrophiles se fixent par liaison covalentes à certains des atomes constituant les bases puriques et pyrimidiques de l'ADN. Ils vont permettre la formation de pontages entre les brins d'ADN. Ceux-ci sont responsables d'un défaut de réplication de l'ADN et donc de la mort cellulaire.

Les intercalants sont des molécules possédant une structure plane venant s'insérer entre deux brins d'ADN. La présence d'une substance intercalée entre les deux brins d'ADN va perturber l'action de la topoisomérase. On peut citer dans cette catégorie : la doxorubicine et le mitoxantrone.

Les inhibiteurs de la topoisomérase I et II gênent à la fois la transcription et la réplication de l'ADN en dérangeant le superenroulement de l'ADN. Le topotecan, la doxorubicine ainsi que la mitoxantrone présentent ces caractéristiques.

Les anticancéreux de type antimétabolique inhibent une ou plusieurs étapes de la synthèse des acides nucléiques.

Les agents tubulo-affins ou alcaloïdes végétaux bloquent la division cellulaire en interférant avec la synthèse des microtubules et la formation du fuseau mitotique, essentiel pour la division cellulaire. Le paclitaxel est régulièrement utilisé dans cette optique.

On peut également citer d'autres types de médicaments anticancéreux cytotoxiques tels que : la bléomycine (composé scindant l'ADN), l'asparaginase,...

Les cellules les plus sensibles à la chimiothérapie sont celles capables de se diviser rapidement. Or les tumeurs possèdent une plus forte proportion de cellules en cours de division que les tissus sains. Néanmoins, il existe d'autres cellules à division rapide, telles que les cellules responsables de la pousse des cheveux, de la régénération de l'épithélium intestinal ou les cellules sanguines. Par conséquent, la chimiothérapie affecte aussi ces cellules non pathogènes et entraîne de nombreux effets secondaires tels que : l'alopécie, la modification de la formule sanguine (aplasie, leucopénie, anémie,...), des troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhée, constipation), ... Les doses que l'on administre sont limitées afin d'éviter un maximum d'effets indésirables.

La résistance aux composés chimiothérapeutiques constitue la cause principale des échecs en chimiothérapie anticancéreuse (Schorderet and collaborateurs, 1998).

De façon générale, de nombreuses tumeurs répondent très bien à la chimiothérapie durant la phase initiale du traitement. Cependant, elles peuvent développer au fur et à mesure des séances une résistance à ces agents par l'intermédiaire de nombreux mécanismes



comprenant : une diminution de leur intégration, une augmentation de leur détoxification, une augmentation de leur élimination (Schorderet and collaborateurs, 1998). Ces mécanismes peuvent même aboutir à une résistance à de multiples drogues (« Multi Drug Resistance » : MDR). Cette résistance est principalement due à une surexpression de transporteurs transmembranaires. Ceux-ci expulsent les agents pharmacologiques à l'extérieur des cellules et leur confèrent une capacité de résistance aux antibiotiques ou agents antitumoraux.

Ces protéines font partie de systèmes de transport à *ATP binding cassette* (ABC). Ces transporteurs utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour l'import ou l'export unidirectionnel d'une variété considérable de substrats, d'ions et de macromolécules. A titre d'exemple, on peut citer la P-glycoprotéine comme faisant partie de la famille des protéines conférant aux cellules une résistance aux drogues cytotoxiques (Dean et al., 2001).

Un autre mécanisme de cette résistance pléiotropique, ferait intervenir l'expression de protéines antiapoptotiques. En effet, les médicaments chimiothérapeutiques utilisent le mécanisme d'apoptose pour détruire les cellules cancéreuses (Liu et al., 1999).

#### ***d. Hormonothérapie***

Certains cancers dont notamment le cancer du sein, de la prostate ou de la thyroïde sont hormonodépendants. Ils sont sensibles à certaines hormones présentes dans l'organisme qui activent leur prolifération. Différents types de traitements sont utilisés : soit on bloque la production d'hormone, soit on empêche l'hormone d'agir sur le récepteur hormonal, entre autre, par l'utilisation d'anticorps.

#### ***e. Autres approches***

En matière de traitement du cancer, les perspectives sont prometteuses. Une approche implique la stimulation de certaines cellules par des agents biologiques, qui peuvent détruire les cellules malignes. Le meilleur exemple est l'interleukine 2, une substance qui active les lymphocytes tueurs (Atkins et al., 2004).

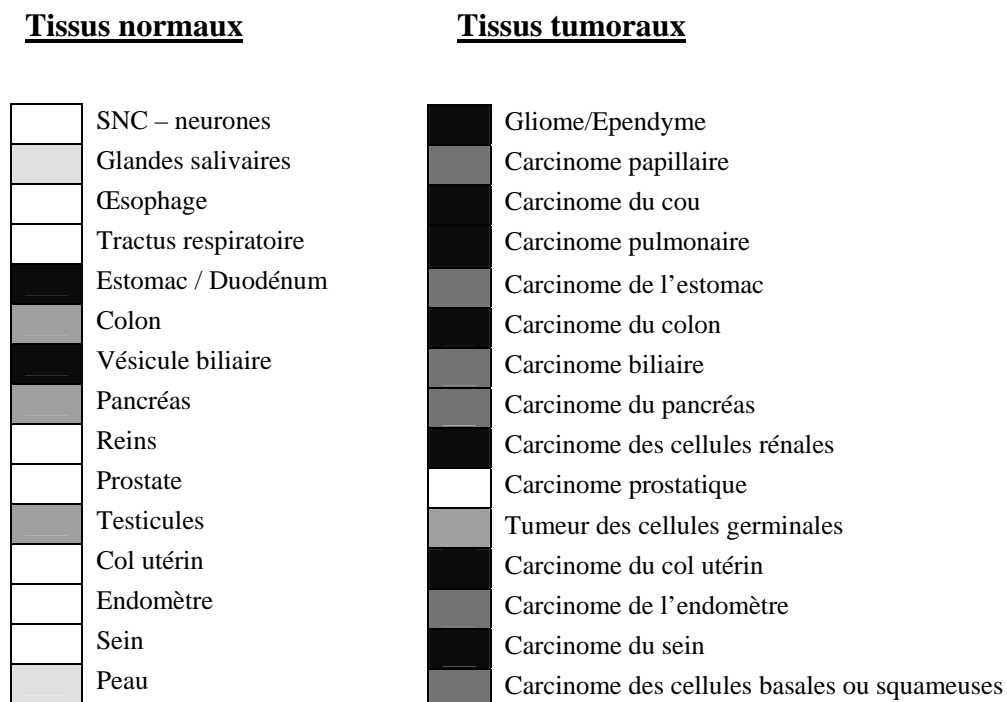
Des chercheurs s'intéressent aux antigènes tumoraux contre lesquels des anticorps seraient susceptibles d'agir. Ces anticorps seraient capables de reconnaître la cellule maligne et de s'y fixer. Ils aideraient ainsi les médicaments à trouver leur cible (vectorisation).

Des travaux sur l'angiogenèse semblent porteurs d'espoir, bien qu'ils n'en soient qu'au stade de l'expérimentation animale. Ils se fondent sur des mécanismes moléculaires et tissulaires impliqués dans la vascularisation des tumeurs. Ils s'opposent au développement des vaisseaux sanguins qui fournissent les substances nutritives aux cellules tumorales leur permettant de se multiplier (néoangiogenèse) (Carmeliet, 2005).

La thérapie génique offre également des perspectives prometteuses. Les premiers essais cliniques chez l'homme n'ayant débuté qu'au début des années nonante.

L'amélioration de nos connaissances concernant la biologie de la cellule cancéreuse ainsi que son étiologie, a permis de mettre en évidence de nouveaux récepteurs, de nouvelles protéines qui deviennent autant de cibles thérapeutiques potentielles permettant de ralentir, voire d'inhiber la croissance tumorale. Il est important de pouvoir cibler de façon spécifique les cellules cancéreuses. Dans cette optique, les antigènes spécifiques de tumeur représentent une voie pleine d'avenir.

L'AC IX et XII sont deux marqueurs de tumeurs hypoxiques. Ces enzymes membranaires sont surexprimés dans de nombreux cancers. Elles peuvent être utilisées afin d'élaborer un diagnostic. Leur inhibition représente également une voie d'avenir dans les traitements cancéreux.



**Figure 11 :** Distribution schématique de l'AC IX dans les tissus normaux et tumoraux (Pastoreková and Pastorek, 2004). L'intensité du gris augmente avec l'expression de l'AC IX.

## 1.2.2. Anhydrase carbonique de type IX

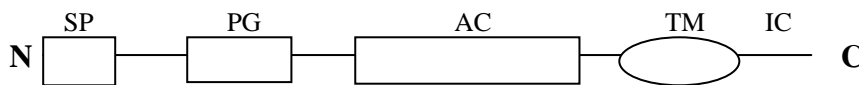
(Pastoreková and Pastorek, 2004)

### 1.2.2.1. Généralités

L'AC de type IX fut découverte pour la première fois dans une lignée cellulaire de carcinome humain (Hela) et fut initialement prénommée antigène MN (Ag MN) (Pastorekova et al., 1992). Des études ont révélé que certaines lignées cellulaires tumorales étaient associées à la présence de l'Ag MN typique (Zavada et al., 1993). Dans les tissus sains correspondant, l'expression de cet antigène était totalement absente. Cette protéine constitue par conséquent un important marqueur de tumeur. Plus tard, des scientifiques ont isolé et analysé la séquence du cDNA de l'Ag MN. Ils déterminèrent que cet Ag présentait une grande homologie avec les anhydrases carboniques de type  $\alpha$  (Wingo et al., 2001). Elle fut ainsi renommée: l'AC IX.

Une seule copie du gène *AC9* fut découverte dans le génome humain. Ce gène code pour une protéine trimérique de 466 acides aminés constituée de différentes parties (**Figure 12**):

- peptide signal (SP)
- région protéoglycanée (PG)
- domaine catalytique (AC)
- domaine trans-membranaire (TM)
- queue intracellulaire (IC)



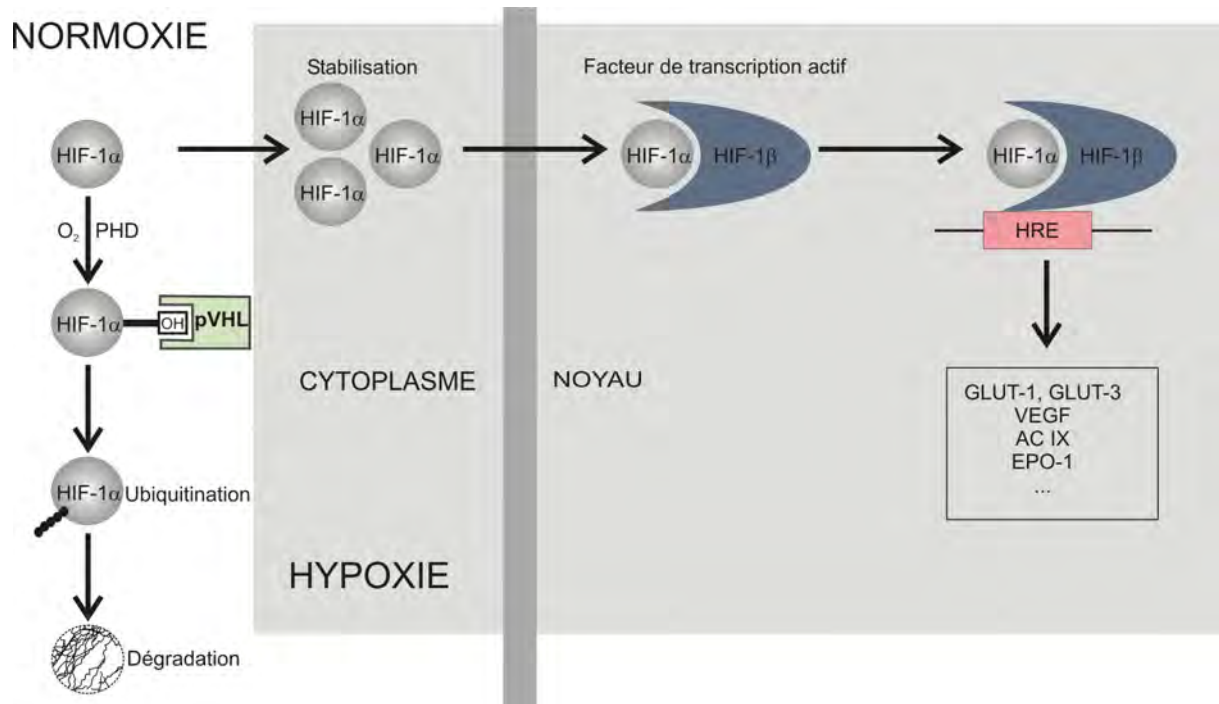
**Figure 12 :** Représentation schématique de l'AC IX.

Le domaine catalytique de l'AC IX se trouve du côté extracellulaire N-terminal. La région protéoglycanée est uniquement présente au niveau de l'AC IX et lui confère un rôle dans les processus d'adhésion cellulaire (Svastova et al., 2003 ; Zavada et al., 2000). Cette région caractéristique de l'AC IX est constituée d'une répétition d'acides aminés acides comme l'aspartate et le glutamate, arrangés en clusters de tripeptides.

Cette protéine transmembranaire peut aisément être détectée par expériences immunohistochimiques, son poids moléculaire est de 54/58 Kd. La formation de doubles bandes est probablement due à une modification postranscriptionnelle de la protéine (Nogradi, 1998).

### 1.2.2.2. Distribution

L'AC IX présente une distribution particulière. La plupart des tissus normaux à l'exception du tractus gastro-intestinal, n'expriment pas l'AC IX (Pastorekova et al., 1997). Par contre, elle est fortement surexprimée dans de nombreuses tumeurs malignes et bénignes telles que dans les tumeurs d'origine rénale, de l'œsophage, du colon, du poumon, du foie, de l'endomètre, des ovaires, du cerveau, de la peau et des seins (Pastoreková and Pastorek, 2004). Par contre les tumeurs originaires de tissus exprimant un taux naturellement élevé en AC IX, (par exemple le tractus gastro-intestinal), voient leur taux d'expression en AC IX diminuer (Pastoreková and Pastorek, 2004). La **Figure 11** représente l'expression de l'AC IX dans différents tissus normaux et tumoraux.



**Figure 13 :** Mécanisme de l'expression de gènes induit par l'hypoxie. Abréviation : VHL : Protéine von Hippel-Lindau, HRE: Hypoxia response element, VEGF: vascular endothelial growth factor, PHD : prolyl-4-hydroxylase (Pastoreková and Pastorek, 2004).



### 1.2.2.3. Expression

L'expression de l'AC IX est régulée à la fois par l'hypoxie et par une protéine suppressive de tumeur appelée « von Hippel-Lindau » (pVHL). La **Figure 13** résume ces mécanismes de régulation.

L'hypoxie existant dans l'environnement tumoral résulte d'un apport insuffisant d'oxygène, dû à une modification ou à une mauvaise distribution des vaisseaux sanguins au niveau de la tumeur. L'oxygène est cependant un substrat essentiel car il sert d'accepteur final des électrons dans la respiration cellulaire et permet aux cellules de synthétiser de l'ATP via la phosphorylation oxydative (Marieb, 1999). En réponse à cette hypoxie, les cellules eucaryotes vont s'adapter afin de s'assurer un apport en ATP suffisant pour survivre. D'une manière générale, ces adaptations se traduisent par une réorganisation du métabolisme énergétique entraînant d'une part, une production d'ATP indépendante de la présence d'oxygène (activation de la glycolyse) et d'autre part, une augmentation du transport du glucose vers l'intérieur de la cellule (Hockel and Vaupel, 2001 ; Kim et al., 2005). L'activation de la néoangiogenèse est une autre forme d'adaptation. Celle-ci semble nécessaire aux apports nutritifs et aux apports d'oxygène indispensables à la croissance tumorale. Ces mécanismes adaptatifs sont issus de l'activation directe de divers facteurs de transcription en condition d'hypoxie. Le facteur le plus important dans cette réponse est HIF-1 (*Hypoxia Inductible Factor-1*). Ce facteur est une protéine dimérique composée d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ . Si, la sous-unité  $\beta$  est produite de façon constitutive, la sous-unité  $\alpha$  est uniquement fonctionnelle dans des conditions d'hypoxie.

En condition d'hypoxie, la sous-unité  $\alpha$  est stabilisée et s'accumule dans le cytoplasme. Elle est ensuite transloquée dans le noyau où elle va se dimériser avec la sous-unité  $\beta$ . Le facteur HIF-1 est ainsi actif et peut se fixer au niveau de l'élément de réponse de l'hypoxie (*HRE : Hypoxia Responsive Elements*) qui se situe dans la région promotrice des gènes cibles. Le facteur de transcription HIF a la capacité d'activer de nombreux gènes dont ceux utiles aux diverses adaptations de la cellule en condition d'hypoxie. On peut citer plus précisément les gènes codant pour des transporteurs de glucose (GLUT-1, GLUT-2), ceux codant pour les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire néangiogéniques (VEGF), l'érythropoïétine (EPO) (Hockel and Vaupel, 2001 ; Zhou et al., 2005). L'AC9 est également un gène cible du facteur de transcription HIF, ce qui explique l'implication de la protéine AC IX en tant que marqueur hypoxique dans certaines tumeurs.

Un autre mécanisme régulateur implique une protéine produite par le gène suppresseur de tumeur de von Hippel Lindau (VHL) qui régule négativement l'expression de l'AC IX (Kim et al., 2005 ; Kivela et al., 2000). Pour les cellules tumorales se trouvant en normoxie, la sous-unité HIF-1 $\alpha$  va être hydroxylée, au niveau d'un résidu proline, par la prolyl 4-hydroxylase (PDH). La protéine VHL suppressive de tumeur va reconnaître le facteur HIF-1 $\alpha$  hydroxylé ce qui va conduire à sa dégradation par l'intermédiaire de l'ubiquitination et du protéasome (Ivan et al., 2001 ; Jaakkola et al., 2001). Par contre, en condition d'hypoxie la PHD est inactive, le résidu proline n'est plus hydroxylé et la dégradation du facteur HIF-1 $\alpha$  par pVHL ne peut plus s'exercer.

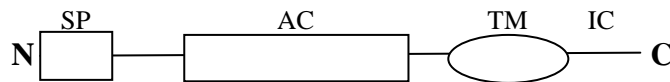
Des mutations au niveau de la pVHL, sont responsables de l'expression constitutive de HIF-1. Ce facteur de transcription va par la suite exercer son action sur une série de gènes dont le gène AC9. La surexpression de l'AC IX dans certains cancers, dont notamment le carcinome de cellules rénales (CCS) (Gnarra et al., 1994) peut s'expliquer par ces mutations au niveau de la protéine suppressive de tumeur. L'introduction du gène sauvage VHL dans ce type de carcinome supprime l'expression de l'AC IX.



### 1.2.3. Anhydrase carbonique de type XII

(Pastoreková and Pastorek, 2004)

L'AC XII est une glycoprotéine transmembranaire de 354 acides aminés et son poids moléculaire est de 39,448 Da. Elle se compose de diverses parties distinctes (**Figure 14**), dont un peptide signal (SP), un domaine N-terminal extracellulaire porteur du domaine catalytique (AC), une hélice- $\alpha$  transmembranaire (TM) et un court domaine C-terminal intracellulaire (IC) porteur de deux sites de phosphorylation (Tureci et al., 1998).



**Figure 14 :** Représentation schématique de l'AC XII.

L'AC XII, tout comme l'AC IX présente une distribution particulière. Cette enzyme est un important marqueur de tumeurs. Elle est en effet surexprimée à la surface cellulaire de certains cancers dont le carcinome de cellules rénales (CCR) ainsi qu'au niveau du cancer pulmonaire. Turcei (1998) et Ivanov (1998) ont démontré que l'ARN messager de l'*AC12* est cependant exprimé au niveau de divers tissus sains tels que le rein, le pancréas, le colon, la prostate, l'ovaire, le testicule, le poumon et l'encéphale (Ivanov et al., 1998 ; Pastoreková and Pastorek, 2004).

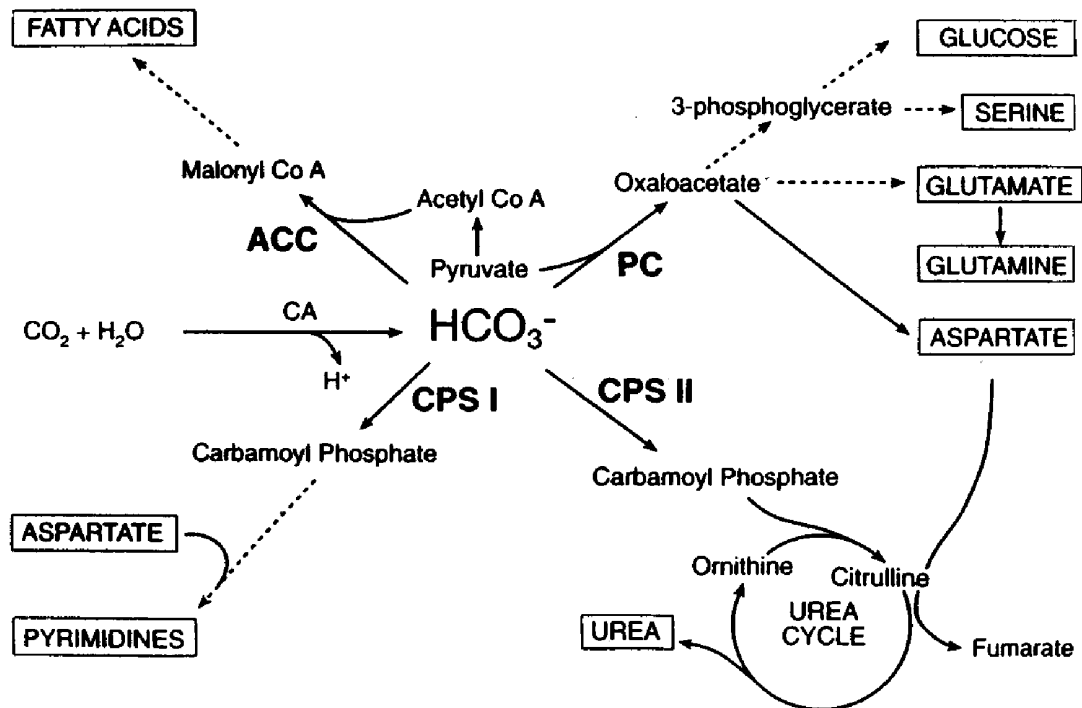
Tout comme l'AC IX, la transcription de l'AC XII est régulée par la protéine suppresseur de tumeur (pVHL) (Ivanov et al., 1998). Par conséquent, la perte d'expression de cette protéine dans les CCR, expliquerait éventuellement la surexpression de l'AC XII dans ce type de cellule tumorale (Latif et al., 1993). Cependant, le gène *AC12* ne semble pas contenir d'HRE semblables à ceux présents au niveau de la région promotrice de l'*AC9*. Pour cette raison, l'expression de cette isoforme ne semble pas être régulée par le phénomène d'hypoxie, au même titre que l'AC IX.

L'AC XII, tout comme l'AC IX est responsable de l'acidification du milieu extracellulaire au niveau des cellules tumorales. Cet environnement étant favorable à la croissance cellulaire tumorale ainsi qu'au phénomène d'invasion (Pastoreková and Pastorek, 2004).

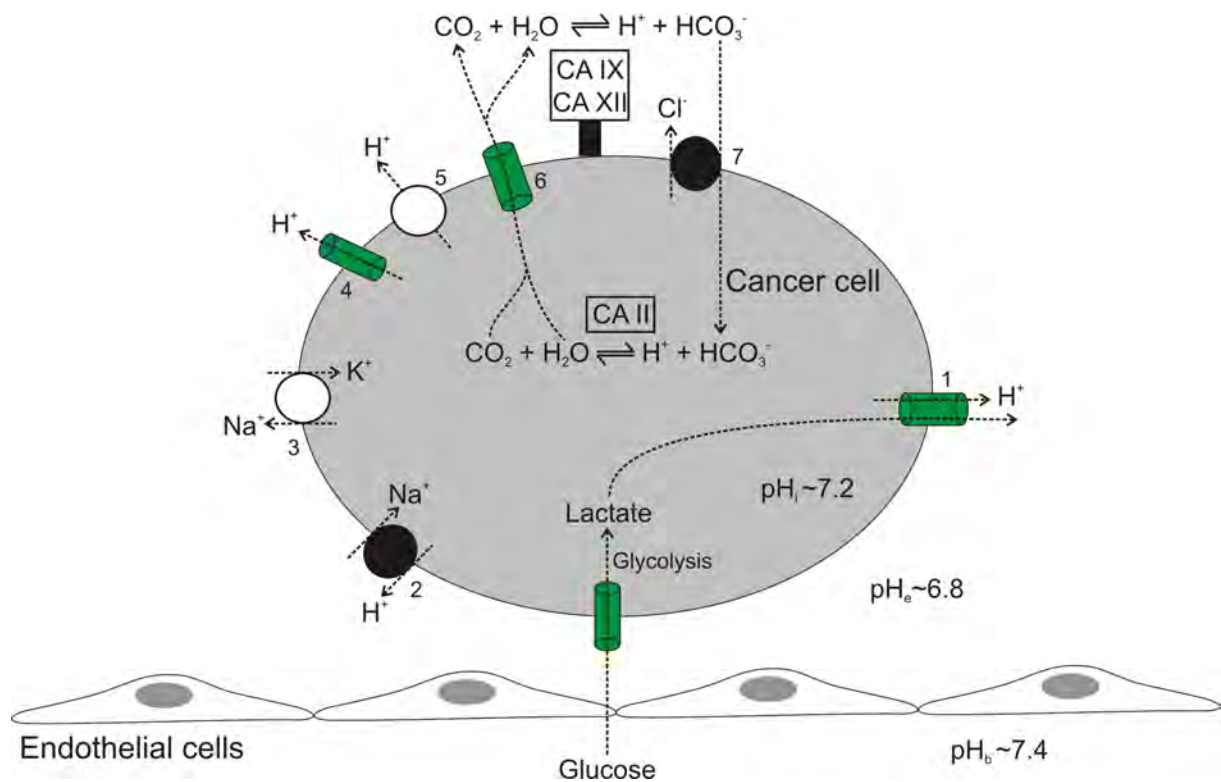
### 1.2.4. Impact de l'AC IX et XII dans le cancer

Le rôle de l'AC IX et XII dans le cancer n'est pas encore exactement connu, mais plusieurs hypothèses sont émises quant à son activité physiopathologique.

Il semblerait qu'elles interviendraient dans des conditions d'hypoxie ou de normoxie pour la survie des cellules tumorales (Robertson et al., 2004). Elles jouent un rôle notamment dans l'approvisionnement de substrats pour diverses réactions biosynthétiques (Chegwidden et al., 2000). Elles permettent une modification du pH extracellulaire, rendant l'environnement propice au développement des cellules cancéreuses (Fukumura et al., 2001 ; Reynolds et al., 1996).



**Figure 15 :** Réactions de carboxylation qui nécessitent du bicarbonate comme substrat. Abréviations : ACC : AcétylCoA Carboxylase, CPS : Carbamoyl Phosphate Synthétase, PC : Pyruvate Carboxylase (Chegwidden et al., 2000).



**Figure 16 :** Représentation schématique des mécanismes utilisés par la cellule cancéreuse afin d'acidifier le milieu extratumoral. (1) : cotransporteur monocarboxylate/H<sup>+</sup>, (2) : antiport Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, (3) : antiport Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP-dépendant, (4) : canal à proton, (5) : antiport membranaire (H<sup>+</sup>/ATPase), (6) : aquaporines, (7) : antiport HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup>. (Ivanov et al., 2001 ; Pastoreková and Pastorek, 2004 ; Stubbs et al., 2000).

#### 1.2.4.1. Réactions biosynthétiques

Diverses réactions biosynthétiques nécessitant une première étape de carboxylation utilisent principalement comme substrat l'ion bicarbonate fournit par l'anhydrase carbonique.

En effet, la pyruvate carboxylase, une enzyme largement utilisée par l'organisme pour des processus biosynthétiques, utilise cet ion pour synthétiser *de novo* divers acides aminés non essentiels tels que l'aspartate, la glutamine et la glycine. Ceux-ci seront utilisés pour la synthèse des bases puriques et pyrimidiniques. La pyruvate carboxylase intervient également dans les réactions de néoglucogenèse. Cette enzyme couplée à l'acétyl-CoA carboxylase utilise l'ion bicarbonate pour la synthèse de lipides membranaires structuraux. Ceux-ci sont ensuite employés par les cellules cancéreuses lors de la formation de nouvelles membranes cellulaires. La carbamoyl phosphate synthétase I intervient dans la synthèse de nucléotides pyrimidiques (**Figure 15**).

Dans des conditions physiologiques qui demandent une augmentation de l'activité des réactions biosynthétiques, on observe une production d'anion bicarbonate supplémentaire catalysée par l'anhydrase carbonique (Chegwidden et al., 2000). Cette situation est notamment présente au niveau des cellules cancéreuses. En effet, la réplication cellulaire y est élevée ce qui engendre une synthèse accrue de nucléotides et de constituants cellulaires structuraux.

#### 1.2.4.2. pH extracellulaire (pH<sub>e</sub>)

Les cellules cancéreuses utilisent divers mécanismes afin de stabiliser le pH intracellulaire (pH<sub>i</sub>) et d'acidifier leur milieu externe (**Figure 16**) ; le gradient de pH étant favorable à la croissance cellulaire (Stubbs et al., 2000). Il a été démontré depuis de nombreuses années que l'acidification présente aux alentours des tumeurs est causée principalement par l'accumulation d'acide lactique (Stubbs et al., 2000). Celui-ci est produit durant la glycolyse. Lors de ce processus, le glucose est converti en deux molécules d'acide pyruvique, avec la production nette de deux ATP par molécule de glucose. En absence d'oxygène cet acide pyruvique sera converti en acide lactique (Marieb, 1999). Celui-ci est éliminé de la cellule dans le milieu extratumoral par l'intermédiaire d'un cotransporteur monocarboxylate/H<sup>+</sup> (**Figure 16**). L'acide lactique s'accumule dans l'environnement proche de la tumeur, faute d'une vascularisation adéquate, favorable à l'élimination de ce catabolite (Stubbs et al., 2000). La glycolyse est particulièrement prononcée dans un tissu en hypoxie puisque les cellules activent leur métabolisme anaérobie pour générer de l'énergie (ATP) en quantité suffisante afin de subvenir à leurs besoins.

Cependant, des expériences réalisées sur des cellules déficientes en processus glycolytiques, ont permis de mettre en évidence que l'acide lactique n'est pas le seul facteur participant à une acidification de l'environnement extratumoral. Le CO<sub>2</sub> représente également une source significative d'acidité (Svastova et al., 2004 ; Svastova et al., 2003). La **Figure 16** reprend de façon schématique les divers mécanismes utilisés par la cellule cancéreuse afin d'acidifier le milieu extratumoral. Les AC IX et XII membranaires catalysent la formation d'ions bicarbonates et de protons. Un antiport HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup> contribue au transport des anions bicarbonates vers l'intérieur de la cellule. Ceux-ci y exercent leur pouvoir tampon et captent les protons. Cette réaction est catalysée par l'AC II cytosolique. Les produits de cette catalyse (eau et dioxyde de carbone) sont véhiculés vers l'extérieur de la cellule par des aquaporines. Ils sont ainsi disponibles pour les ACs XII et IX membranaires. De plus, un antiport Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> permet l'exportation d'un proton en échange de l'importation d'un ion sodium, ce qui contribue à élever la concentration intracellulaire du Na<sup>+</sup>. Celui-ci est par la suite expulsé vers



l'extérieur par la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Les protons intracellulaires peuvent également être exportés par des ATPases de type vacuolaire (Pastoreková and Pastorek, 2004).

Par ces multiples mécanismes, on obtient au niveau des cellules cancéreuses un gradient de pH négatif. Ce qui signifie que le  $\text{pH}_i$  est plus élevé que le  $\text{pH}_e$ . Le phénomène inverse s'observe au niveau des cellules saines (Stubbs et al., 2000). Le faible  $\text{pH}_e$  va avoir une action régulatrice positive sur certains facteurs de croissance (VEGF, Il-8, ...), sur des protéases (MMP, ...). En condition acide, on observe une perte des jonctions intercellulaires favorisant la migration et la formation de métastases. Cet environnement favorise également les mutations et est défavorable aux mécanismes de réparation de l'ADN (Fukumura et al., 2001 ; Kato et al., 1992 ; Reynolds et al., 1996 ; Xu and Fidler, 2000).

Un pH acide peut également avoir une influence au niveau de la résorption et l'activité des médicaments anticancéreux, par une modification de leur degré d'ionisation (Stubbs et al., 2000). La majorité des composés anticancéreux sont soit des bases faibles, soit des acides faibles. Dans un environnement acide, une base faible aura tendance à se protonner et traversera moins aisément la membrane cellulaire. Pour cette raison, les composés auront une cytotoxicité moins élevée (Raghunand et al., 1999). On peut citer comme exemple de bases faibles, la doxorubicine, la mitoxantrone, le paclitaxel et le topotecan qui se sont révélés moins cytotoxiques lors d'une baisse de  $\text{pH}_e$  (Raghunand et al., 1999 ; Vukovic and Tannock, 1997).

Il ne faut cependant pas oublier qu'un  $\text{pH}_e$  acide est par contre tout à fait favorable à la résorption d'un acide faible.

Une inhibition des isoformes IX et XII d'AC, et plus particulièrement de l'AC IX, présente de nombreuses perspectives thérapeutiques. En effet, en raison de sa surexpression dans les tissus tumoraux, l'AC IX semble contribuer au mécanisme physiopathologique du cancer. Inhiber sélectivement l'AC IX permettrait d'augmenter le pH extratumoral et favoriserait par conséquent, la résorption des bases faibles qui sont fréquemment utilisées dans les traitements anti-cancéreux. Leur cytotoxicité sera améliorée et les doses administrées pourraient être diminuées, réduisant les multiples effets indésirables liés à la chimiothérapie. L'utilisation d'inhibiteurs sélectifs d'AC IX et/ou XII pourrait également avoir une implication dans les phénomènes d'invasion et de prolifération tumorale.

**Tableau 5 :** Classification des crises épileptiques.

I. Crises partielles
A. Crises partielles simples
1. Avec symptomatologie motrice
2. Avec symptomatologie sensorielle
3. Avec symptomatologie végétative
4. Avec symptomatologie psychique
B. Crises partielles complexes
1. Avec début partiel simple
2. Avec altération de l'état de conscience d'emblée
C. Crises partielles secondairement généralisées
II. Crises généralisées
A. Absence
B. Crise myocloniques
C. Crises cloniques
D. Crises toniques
E. Crises tonico-cloniques
F. Crises atoniques
III. Crises non classifiables

(Schorderet and collaborateurs, 1998)



### 1.3. Anhydrase carbonique et épilepsie

(Porter and Meldrum, 2000 ; Thiry<sup>a</sup> et al., 2006)

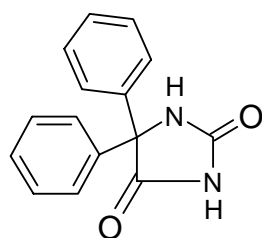
#### 1.3.1. L'épilepsie

L'épilepsie est considérée comme la seconde maladie neurologique la plus fréquente après l'accident vasculaire cérébral. Elle atteint 0,5% à 1% de la population. Par ses décharges paroxysmales dans le cortex cérébral, elle modifie le bon fonctionnement neuronal. La crise épileptique correspond à un déclenchement rapide d'une activité électrique anormale au niveau du cortex cérébral, au sein d'une zone très limitée appelée foyer et peut se propager dans d'autres régions du cerveau. Ce phénomène électrique est également observé lors de convulsions non-liées aux crises épileptiques. En effet, des crises convulsives sont également observées lors de la présence d'une tumeur cérébrale, d'une infection (méningite), d'un désordre métabolique, d'un état fébrile, d'un traumatisme crânien, etc.

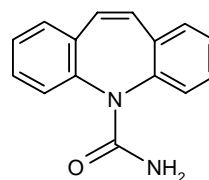
L'excitabilité excessive à l'origine des convulsions est probablement causée par un déséquilibre ionique entre les facteurs excitateurs dépolarisants (entrée de sodium et de calcium) et les facteurs inhibiteurs hyperpolarisants (entrée de chlorure et sortie de potassium). Cette instabilité provient d'une altération membranaire de la conductance aux  $K^+$ , d'un dysfonctionnement des canaux ioniques  $Na^+$  voltages dépendant ou des transports ioniques membranaires ATP dépendant.

De plus, une mauvaise régulation entre les neurotransmetteurs excitateurs (glutamate, signal GABAergique dépolarisant,...) et inhibiteurs (signal GABAergique hyperpolarisant,...) contribuent également à l'apparition de phénomènes électriques excessifs au niveau neuronal (Schorderet and collaborateurs, 1998).

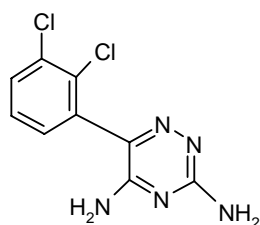
Différents types de crises épileptiques sont distingués (**Tableau 5**) (Schorderet and collaborateurs, 1998). Sur base de leurs manifestations cliniques, de l'anamnèse du patient et du profil obtenu par l'encéphalogramme, deux grands types de crises peuvent être définis: les crises partielles ou focales et les crises généralisées. Les crises partielles se développent au départ d'un seul hémisphère cérébral. Ces crises sont dites simples lorsque l'état de conscience est maintenu et complexe lorsqu'il est altéré. Les crises généralisées quant à elles débutent au niveau des deux hémisphères cérébraux. La phase tonique se caractérise par un raidissement et une contraction de l'ensemble des muscles des membres, du tronc et du visage (muscles oculomoteurs et masticateurs). Les myoclonies sont de brèves contractions (convulsions) irrégulières et isolées alors que les mouvements cloniques sont rythmiques. Cette classification contribue à l'élaboration d'un diagnostic précis du type de crise. Celui-ci étant déterminant pour le choix de la thérapie médicamenteuse à adopter.



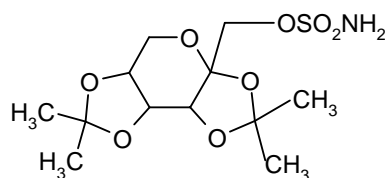
Phénytoïne



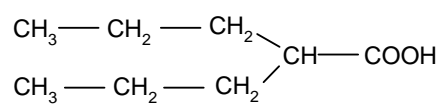
Carbamazépine



Lamotrigine



Topiramate



Acide valproïque

**Figure 17 :** Structure d'agents antiépileptiques.

### 1.3.2. Implication de l'AC dans l'épilepsie

Divers liens existent entre l'AC et l'apparition des convulsions. Premièrement, l'AC intervient dans l'activité excitatrice du récepteur au glutamate. En effet, le glutamate est un important neurotransmetteur excitateur au niveau cérébral. Ce composé va se lier notamment sur le récepteur de type NMDA (*N*-méthyl-D-aspartate). Celui-ci est couplé à un canal ionique. La liaison de ce ligand induit une entrée massive de calcium au niveau du neurone post-synaptique. Cette activité excitatrice est inhibée en présence de protons dans le milieu extracellulaire du récepteur. Par conséquent, l'utilisation d'inhibiteur d'AC est régulièrement utilisée en tant qu'anticonvulsant. En effet, cette inhibition enzymatique contribue à l'accumulation extracellulaire de protons (Thiry<sup>a</sup> et al., 2006).

Deuxièmement, durant la phase épileptique, un efflux massif d'ions bicarbonates au travers des récepteurs au GABA induit un signal GABAergique dépolarisant excitateur. Une entrée importante d'ions potassium à l'intérieur des cellules est couplée à ce mécanisme. Ces deux processus contribuent à l'excitation des cellules neuronales. L'AC VII assure l'approvisionnement en ions bicarbonates. Ceux-ci étant essentiels au maintien d'un gradient favorable aux phénomènes excitateurs.

Troisièmement, l'AC semble jouer un rôle primordial pour le maintien d'un pH intra et extracellulaire stable. En effet, une faible variation de pH affecte de nombreux mouvements ioniques et par conséquent l'activité et l'excitabilité neuronale (Thiry<sup>a</sup> et al., 2006).

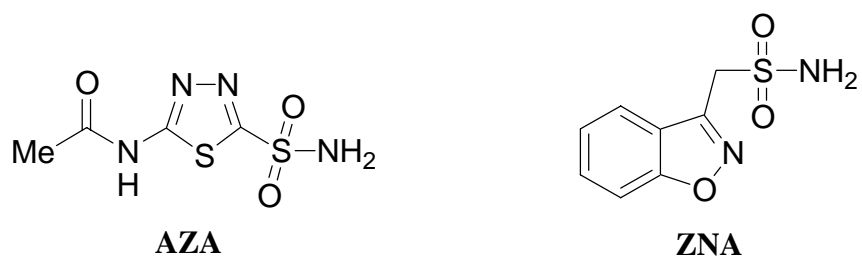
La relation entre les ACs et les mécanismes physiopathologiques des convulsions reste imprécise et compliquée. Les convulsions ne peuvent pas être attribuées à une seule isoenzyme en particulier. On cite l'implication entre autre de l'AC II, IV, V, VII, XII et XIV. Il est certain que plusieurs mécanismes électrophysiologiques, comprenant une variation de pH, la transmission neuronale GABAergique, la liaison du glutamate sur son récepteur NMDA, ainsi que diverses modifications de l'environnement ionique semblent intervenir dans ce processus (Thiry<sup>a</sup> et al., 2006).

### 1.3.3. Mécanismes d'action des médicaments antiépileptiques

Les mécanismes d'action principaux des médicaments antiépileptiques ciblent principalement les canaux ioniques potentiel-dépendant ainsi que les fonctions synaptiques excitatrices et inhibitrices. A la fin de chaque potentiel d'action, les canaux sodiques potentiel-dépendant entrent dans un état inactif. La prolongation de cet état inactif semble être le mécanisme principal de la phénytoïne, la carbamazépine, la lamotrigine, etc. Il pourrait aussi contribuer à l'effet de l'acide valproïque et du topiramate. Les structures chimiques de ces composés sont répertoriées à la **Figure 17**. Le maintien de l'inactivité neuronale diminue ainsi la possibilité d'excitations répétitives au niveau des neurones (Porter and Meldrum, 2000).

De nombreux médicaments antiépileptiques agissent au niveau de la transmission synaptique (Thiry<sup>a</sup> et al., 2006). L'augmentation de l'inhibition dépendant du GABA peut être produite de différentes façons, impliquant soit une action directe sur le complexe des canaux chlore-récepteur GABA (topiramate) ou des actions sur le recaptage ou le métabolisme du GABA.

Une réduction de la neurotransmission glutamatergique stimulante est également un mode d'action important pour de nombreux anticonvulsants (topiramate). Ce type de composé exerce principalement son action en bloquant les récepteurs au glutamate (Schorderet and collaborateurs, 1998).



**Figure 18 :** Structure de l'acétazolamide (**AZA**) et du zonisamide (**ZNA**).

Quelques inhibiteurs d'ACs comme l'acétazolamide et le zonisamide (**Figure 18**) sont parfois utilisés dans le traitement de l'épilepsie. Le zonisamide inhibe l'AC et induirait une diminution de la concentration d'ions  $\text{HCO}_3^-$ , indispensables à la dépolarisation excitatrice (Thiry<sup>a</sup> et al., 2006). De plus, il bloque les canaux sodiques potentiel-dépendant et a également une action inhibitrice sur les canaux calciques voltage-dépendant, facilitant ainsi la neurotransmission dopaminergique et sérotoninergique.

Le topiramate est un nouveau médicament antiépileptique doté de plusieurs mécanismes d'action: il bloque probablement les canaux sodiques, potentialise l'effet inhibiteur du GABA et déprime l'action excitatrice du kaïnate sur les récepteurs AMPA. Récemment, sa capacité d'inhiber plusieurs isoformes de l'AC a été démontrée (Herrero et al., 2002). Cependant l'implication dans l'épilepsie de cette inhibition enzymatique n'est pas encore clairement prouvée.

La recherche médicamenteuse d'anticonvulsants reste une voie prometteuse. Les composés antiépileptiques sur le marché sont symptomatiques et permettent simplement d'empêcher l'apparition de crises, de diminuer leur intensité et leur gravité afin de limiter les dommages cérébraux.

Dans cette optique, les iACs présentent de nombreuses perspectives thérapeutiques. En effet, comme nous l'avons décrit précédemment, diverses isoenzymes d'AC semblent intervenir dans l'étiologie des convulsions.



## **Chapitre 2 : Objectifs**





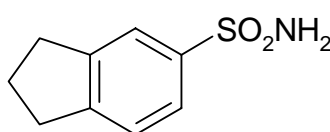
## Chapitre 2 : Objectifs

Quinze isoformes différentes de l'anhydrase carbonique sont exprimées dans le corps humain (AC I - AC XIV). L'AC est une métalloenzyme ubiquitaire qui participe à la catalyse de l'hydratation du dioxyde de carbone en acide carbonique instable qui se dissocie rapidement en bicarbonate et en proton. Elle est impliquée dans diverses fonctions biologiques dont la régulation acido-basique, le remaniement du tissu osseux, la sécrétion d'humeur aqueuse, etc. Certaines isoenzymes de l'AC jouent également un rôle important dans la physiopathologie de certaines maladies dont notamment le cancer et l'épilepsie.

L'isoenzyme IX est surexprimée dans de nombreux tissus tumoraux et est absente des tissus sains. L'isoenzyme XII est présente à la fois dans certaines tumeurs et dans les tissus sains. Ces isoformes interviennent entre autre dans le processus d'acidification de l'environnement extratumoral. Cette diminution de pH favorise la prolifération et l'invasion tumorale mais est défavorable à la résorption des bases faibles couramment utilisées en chimiothérapie. Par conséquent, l'AC IX et l'AC XII constituent une cible thérapeutique intéressante dans le domaine du cancer.

L'isoenzyme VII et XIV seraient quant à elles, plus précisément impliquées dans l'étiologie des convulsions.

Dans cette optique, des dérivés de l'indanesulfonamide (**Figure 19**) ont été synthétisés au Département de Pharmacie. Ils ont été évalués dans un premier temps sur l'AC IX et sur deux autres isoenzymes aux propriétés physiologiques importantes (Thiry<sup>b</sup> et al., 2006). La plupart des composés se sont révélés très actifs sur l'AC II et IX et peu actifs sur l'AC I. Deux dérivés de l'indanesulfonamide se sont distingués par leur pouvoir inhibiteur élevé vis-à-vis de l'AC IX ( $K_i$  de l'ordre de 3 nM) et meilleur que celui de la drogue de référence (acétazolamide). Ils possèdent également une bonne sélectivité par rapport aux AC I et II.



**Figure 19:** L'indanesulfonamide.

Au cours de ce travail, nous évaluerons l'activité inhibitrice de ces mêmes dérivés sur les isoformes VII, XII et XIV de l'AC. Cette étude nous permettra d'établir des relations structure-activité indispensables à la conception et à la synthèse ultérieure d'inhibiteurs plus actifs et sélectifs.

Ensuite, une évaluation biologique des composés les plus actifs sur l'AC IX sera entreprise sur un modèle cellulaire exprimant cette isoforme enzymatique. Etant donné l'implication de l'AC IX dans l'acidification du pH extratumoral, nous espérons mettre en évidence que des inhibiteurs de l'AC IX empêchent cette acidification.



Enfin, les composés présentant un profil biologique intéressant au cours du criblage sur enzymes isolées et ayant un pouvoir inhibiteur élevé vis à vis de l'AC VII et XIV, seront testés sur un modèle de convulsions *in vivo*. Nous utiliserons la technique du « maximal electroshock seizure-test (MES-test) » pour induire des convulsions chez la souris. Cette étude nous permettra de vérifier si nos composés, inhibiteurs d'anhydrases carboniques, protègent les souris des convulsions. Ainsi, nous pourrons mieux comprendre l'implication réelle des AC dans l'étiologie des convulsions.

En conclusion, l'objectif de ce mémoire est d'évaluer pharmacologiquement des dérivés de l'indanesulfonamide en tant qu'inhibiteurs d'anhydrase carbonique. Nous investiguerons, d'une part, leurs activités inhibitrices sur trois enzymes isolées (AC VII, XII et XIV) impliquées dans le cancer et l'épilepsie et, d'autre part, leurs effets biologiques sur un modèle *in vitro* de cellules cancéreuses et sur un modèle *in vivo* de convulsions.



## **Chapitre 3 : Matériel et méthodes**



## Chapitre 3 : Matériel et méthodes

### ***3.1. Détermination de l'activité inhibitrice d'indanesulfonamides***

#### **3.1.1. Généralités**

La détermination de l'activité inhibitrice des indanesulfonamides a été réalisée au sein du « Laboratorio di chimica Inorganica e Bioinorganica » de l'Université de Florence en Italie sous la direction du professeur A. Scozzafava et du docteur C.T. Supuran.

Les isoenzymes VII, XII et XIV d'anhydrase carbonique ont été produites et purifiées par l'équipe de A. Scozzafava au sein de l'Université de Florence (Temperini et al., 2006).

#### **3.1.2. Matériel**

##### 3.1.2.1. Préparation du tampon

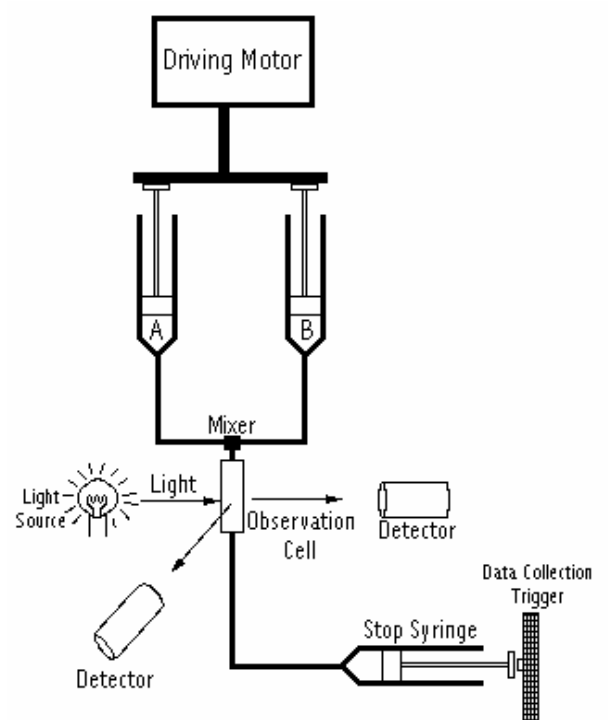
Tous les produits utilisés pour la préparation du tampon proviennent de la firme Sigma-Aldrich. Il est constitué de :

- 10 mM HEPES
- 0,1 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$
- 0,01 M Tris HCl
- pH 7,5

Les mesures doivent être réalisées dans un milieu tamponné pour prévenir la variation du pH. Le sulfate sodique ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) qu'il contient permet de maintenir la force ionique constante.

##### 3.1.2.2. Préparation des solutions stocks d'inhibiteur

Les solutions stocks d'inhibiteur ( $10^{-2}\text{M}$ ) sont préparées avec la solution tampon et 20% à 40% de DMSO en fonction de la solubilité des composés. Des dilutions successives sont ensuite réalisées jusqu'à une concentration de  $0,1\text{ }\mu\text{M}$  ( $10^{-7}\text{M}$ ).



**Figure 20 :** Stopped flow couplé à son détecteur.



### 3.1.2.3. Préparation de la solution enzymatique

Les différentes enzymes sont utilisées à une concentration de  $10^{-7}$ M dans la solution tampon. Ensuite, on ajoute à cette préparation quelques milligrammes du rouge de phénol à une concentration de 2 mM qui servira d'indicateur. Il vire au jaune en milieu acide. L'absorbance maximale de cet indicateur se situe à une longueur d'onde de 557 nm. Son absorbance diminue au cours du temps et est détectée par un spectrophotomètre UV-Visible.

### 3.1.2.4. Préparation des échantillons

En pratique, 70  $\mu$ L de chacune des solutions d'inhibiteur ( $10^{-3}$ M à  $10^{-7}$ M) sont placés dans un tube en plastique. On ajoute ensuite 630  $\mu$ L de la solution d'enzyme. Nous obtenons ainsi, une concentration finale en inhibiteur comprise entre  $10^{-4}$ M à  $10^{-8}$ M. L'enzyme est incubée durant quinze minutes en présence de l'inhibiteur à température ambiante. Cette incubation permet la formation du complexe enzyme-inhibiteur. Les mesures sont prises à température ambiante.

### 3.1.2.5. Préparation de la solution substrat

Cette solution est obtenue en saturant de l'eau par du gaz carbonique durant 15 à 25 minutes. La solution saturée en gaz carbonique est maintenue dans un système clos pour éviter la diffusion du gaz carbonique dans l'air ambiant.

## **3.1.3. Méthode**

### 3.1.3.1. Appareil de type stopped flow

Pour rappel, la réaction d'hydratation du  $\text{CO}_2$  catalysée par l'AC induit la formation d'ions bicarbonates et de protons. Cette enzyme induit donc une acidification du milieu qui peut être détectée par la présence d'un indicateur colorimétrique, sensible à cette variation de pH. La mesure de la réaction d'hydratation du  $\text{CO}_2$  par l'anhydrase carbonique est réalisée avec un appareil de type SX.18MV-R Applied Photophysics stopped flow (**Figure 20**).

Son principe de fonctionnement est relativement simple et permet un mélange très rapide de plusieurs solutions. Il permet ainsi de suivre avec précision le début de la cinétique enzymatique afin de mesurer les vitesses initiales de réaction. Une seringue contient l'anhydrase carbonique (VII, XII ou XIV) incubée en présence de la solution inhibitrice. Une seconde seringue contient le substrat. Une pression rapide est appliquée au niveau de ces deux seringues au moyen d'un piston. Les deux solutions sont mises en contact, et se retrouvent au niveau d'une « cellule d'observation ». L'absorbance est déterminée par un spectrophotomètre UV-Visible. La « stop seringue » permet simplement de vider le contenu de la cellule d'observation. Entre chaque composé tout le système doit être minutieusement rincé.

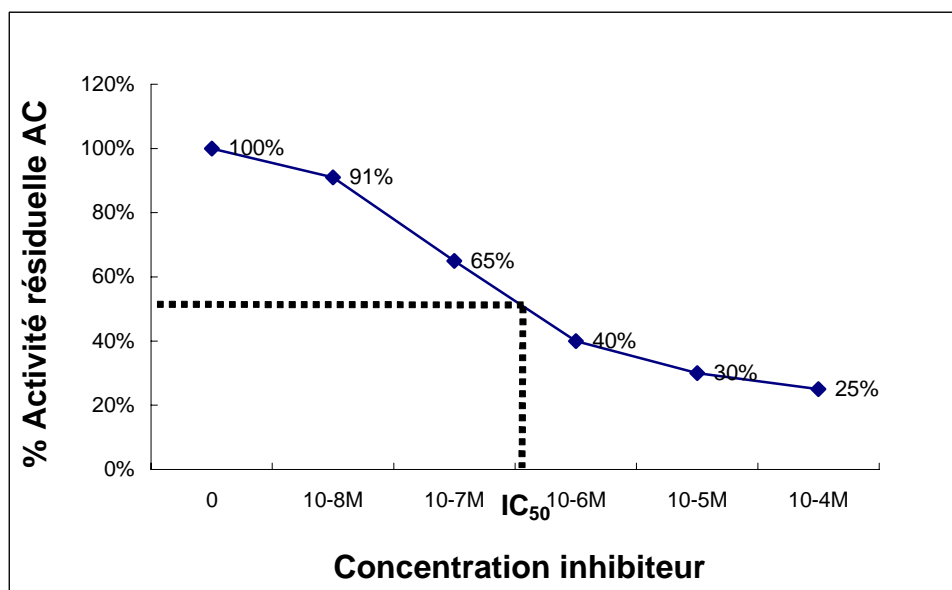


### 3.1.3.2. Détermination de l' $IC_{50}$ et du $K_i$

On réalise un blanc avec la solution contenant l'enzyme, le tampon et le rouge de phénol. L'absorbance mesurée diminue en fonction du temps. La valeur de la pente nous indique le 100% d'activité de l'enzyme. La valeur de chaque pente observée est déterminée pour les différentes concentrations d'inhibiteurs utilisées ( $10^{-4}M$  à  $10^{-8}M$ ). Plus un inhibiteur est actif et plus la pente de la courbe sera faible. Le pourcentage d'activité enzymatique est ensuite calculé en effectuant le rapport entre la valeur de la pente obtenue en présence de l'inhibiteur et celle obtenue avec le blanc. On reporte sur un graphique (**Figure 21**) les résultats de pourcentage d'activités enzymatiques en fonction des diverses concentrations en inhibiteurs. La concentration en drogue réduisant de 50% ( $IC_{50}$ ). L'activité enzymatique est déterminée graphiquement et correspond à 50% de l'activité enzymatique.

Les  $K_i$  sont calculés à partir des  $IC_{50}$  à l'aide de l'équation décrite par Cha pour une cinétique d'inhibition de type non compétitive :  $K_i = IC_{50} - E_t / 2$  où  $E_t$  correspond à la concentration totale en enzyme (Cha, 1975).

L'acétazolamide est utilisée comme drogue de référence et nous permet ainsi de comparer l'efficacité de nos composés.



**Figure 21 :** Graphe du pourcentage d'activité résiduelle de l'enzyme en fonction des concentrations en inhibiteur pour la détermination de l' $IC_{50}$ .



### 3.2. Culture cellulaire

La lignée cellulaire utilisée au cours de ce mémoire est la lignée MCF-7. Il s'agit de cellules épithéliales adhérentes. Cette lignée est permanente et issue d'un adénocarcinome mammaire.

#### 3.2.1. Matériel

- PBS stérile (Gibco, UK);
- Trypsine-EDTA (1X), liquide : 0,05% Trypsine, 0,53 mM EDTA (Gibco, UK) ;
- Tubes 15 mL stériles (Falcon, USA) ;
- Pipettes stériles : 2, 5, 10 et 25 mL (Sarstedt, France);
- Boîte de culture 75 cm<sup>2</sup> (T75) (Greiner Bio-One) ;
- Milieu de culture complet stérile pour MCF-7:
  - Milieu RPMI contenant 4,4 g/L de glucose (Gibco, UK) ;
  - Antibiotiques : Penicilline (50 U/mL) (Gibco, UK),  
Streptomycine (50 µg/mL) (Gibco, UK) ;
  - 10% de sérum fœtal de veau décomplémenté (Gibco, UK);
- Hotte: Gelaire, Class II BS 5726;
- Incubateur : Hepa, Class 100, Thermo Electron Corporation.

#### 3.2.2. Méthode

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de cultures T75 contenant 15 mL de milieu de culture complet. Celles-ci sont placées dans une étuve à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>, 95% d'air atmosphérique et 90% d'hygrométrie. Toutes les solutions (PBS, Trypsine-EDTA, milieu de culture complet) utilisées lors des manipulations, ont été préalablement chauffées à 37°C. Les cellules sont repiquées trois fois par semaine, sous une hotte à flux laminaire vertical, selon le protocole suivant.

Le milieu de culture complet est décanté et les cellules sont rincées avec 5 mL de PBS stérile. Une fois le milieu de rinçage décanté, 2 mL de solution Trypsine-EDTA stérile est ajouté afin de détacher les cellules. L'action de la Trypsine-EDTA est neutralisée par l'ajout de 5 mL de milieu de culture complet. La suspension cellulaire est récupérée dans un tube Falcon de 15 mL. Celui-ci est ensuite centrifugé 4 minutes à 1000 rpm. Le surnageant est alors décanté et le culot est resuspendu dans du milieu de culture complet. La suspension cellulaire est répartie, éventuellement après comptage à l'aide d'une cellule de Neubauer, dans des nouvelles boîtes de culture (T75) ou dans des plaques multi-puits (Greiner Bio-One). Les boîtes sont alors placées dans l'incubateur à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub>.



### 3.2.3. Mesure du pH extracellulaire et de la viabilité cellulaire

#### 3.2.3.1. Matériel

- Milieu CO<sub>2</sub> indépendant complet :
  - Milieu CO<sub>2</sub> indépendant (Gibco, UK),
  - L-Glutamine: 200 nM (100X), liquide, 29,2 mg/mL (Gibco, UK),
  - Antibiotiques : penicilline (50 U/mL) (Gibco, UK),  
streptomycine (50 µg/mL) (Gibco, UK).
- Milieu de culture « maison » (1 litre) :
  - 0,9% NaCl,
  - 5 mM de glucose,
  - 1 mM CaCl<sub>2</sub> (2.H<sub>2</sub>O),
  - 1 mM MgCl<sub>2</sub> (6.H<sub>2</sub>O),
  - 3 mM KCl,
  - 0,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,
  - 5,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,
  - 15 mg de rouge de phénol,
  - pH 7,4.
- Microélectrode: Hamilton, *Biotrode*.
- Solution de coloration diluée 100 fois dans du PBS et conservée à 4°C :
  - 50 mg de bromure d'éthidium (Sigma, USA)
  - 15 mg d'acridine orange (Sigma, USA)  
dissous dans 1 mL d'éthanol 95% et dans 49 mL d'eau distillée.
- Microscope à fluorescence (Dialux 22, Leitz).

#### 3.2.3.2. Méthode

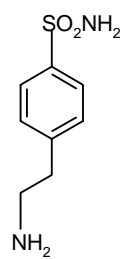
##### ***a. Acidification du milieu extracellulaire et détermination de la viabilité cellulaire***

Différentes conditions d'hypoxie et de normoxie ont été réalisées (8, 24 et 48 heures).

La veille de l'expérience, les plaques multipuits (24 puits) sontensemencées à une densité cellulaire de 150.000 cellules/puits en présence de milieu de culture complet. Pour chaque plaque, les expériences sont réalisées en triple. Le lendemain matin, le milieu est remplacé par du milieu CO<sub>2</sub> indépendant/milieu « maison » : 1 mL/puits. Chaque plaque contient 2 puits « contrôle » avec du milieu CO<sub>2</sub> indépendant /milieu « maison » seul. Une partie des plaques est ensuite ouverte et placée en hypoxie dans un incubateur à 37°C (99% d'azote et 1% d'oxygène) pour une durée variable en fonction des expériences (2, 4, 6, 8, 24 et 48 heures). Les plaques restantes sont incubées en normoxie, sous atmosphère normale maintenue à 37°C pour des durées de 2, 4, 8, 6, 24 et 48 heures.

A la fin des périodes d'incubation en normoxie et hypoxie, le milieu CO<sub>2</sub> indépendant/milieu « maison » est récupéré afin de mesurer rapidement son pH à l'aide d'une microélectrode.

La viabilité cellulaire est déterminée à l'aide d'une solution de bromure d'éthidium et d'acridine orange. L'acridine orange pénètre dans les noyaux des cellules vivantes pour les colorer en vert fluorescent, tandis que le bromure d'éthidium colore en orange le noyau des cellules mortes. Le pourcentage de mortalité sera estimé suite à une observation au microscope à fluorescence.



4-(2-aminoethyl)-benzensulfonamide

**Figure 22 :** Structure d'une drogue de référence.



***b. Incubation avec un inhibiteur d'AC***

La veille de l'expérience, les diverses plaques multipuits sontensemencées à une densité cellulaire de 150.000 cellules/puits en utilisant du milieu de culture complet. Pour chaque plaque, les expériences sont réalisées en triple. Le lendemain matin, ce milieu est remplacé par 1 mL de milieu CO<sub>2</sub> indépendant ou 1 mL de milieu « maison » contenant l'une des deux drogues de référence à 3 concentrations (10<sup>-3</sup>M, 10<sup>-4</sup>M et 10<sup>-5</sup>M).

Les inhibiteurs d'AC utilisés comme référence sont le 4-(2 aminoéthyl)-benzenesulfonamide (**Figure 22**) et l'acétazolamide (Sigma-Aldrich). Afin de faciliter la solubilisation de ces composés, nous avons utilisé du DMSO. Le pourcentage maximal de DMSO supporté par les cellules ne peut dépasser 0,5%. Par conséquent, pour arriver à un tel pourcentage, on réalise une solution stock de drogue à une concentration en inhibiteur de 0,2 M avec 100% de DMSO. Cette solution est ensuite diluée 200 fois dans le milieu CO<sub>2</sub> indépendant ou dans le milieu « maison » afin d'obtenir une solution à une concentration en inhibiteur de 10<sup>-3</sup>M avec 0,5% de DMSO. Ensuite, des dilutions successives sont entreprises pour obtenir des concentrations en inhibiteur de 10<sup>-4</sup>M et 10<sup>-5</sup>M.

Divers contrôles sont ajoutés dans chaque plaque: milieu CO<sub>2</sub> indépendant, milieu maison, milieu contenant du DMSO à 0,5%, milieu avec inhibiteur à 10<sup>-3</sup>M, 10<sup>-4</sup>M et à 10<sup>-5</sup>M.

Une partie des plaques sont ensuite ouvertes et placées en hypoxie dans un incubateur à 37°C (99% d'azote et 1% d'oxygène) pour une durée variable en fonction des expériences. Les plaques restantes sont incubées en normoxie, sous atmosphère normale maintenue à 37°C.

Lorsque les périodes d'incubation en normoxie et hypoxie sont terminées (24 h pour le milieu CO<sub>2</sub> indépendant et 8 h pour le milieu maison), le milieu CO<sub>2</sub> indépendant/milieu maison est récupéré afin de mesurer son pH.

***c. Incubation overnight avec un inhibiteur d'AC***

Le mode opératoire est similaire à celui décrit au point b. La veille de l'expérience, les diverses plaques multipuits sontensemencées à une densité cellulaire de 150.000 cellules/puits en utilisant du milieu de culture complet. Lorsque les cellules sont bien adhérentes, le milieu de culture est décanté et remplacé par du milieu RPMI complet contenant la drogue de référence à des concentrations de 10<sup>-3</sup>M à 10<sup>-5</sup>M. Un groupe contrôle est également réalisé : le milieu est simplement remplacé par du milieu de culture complet.



### 3.3. Maximal electroshock seizure-test : MES-test

Les souris mâles OF1 (Charles River, France) pèsent entre 22 et 24 g et sont âgées environ de 5 semaines. Avant l'expérimentation, les souris ont libre accès à la nourriture et à l'eau.

Le protocole a été accepté par la commission éthique animale de l'Université de Liège.

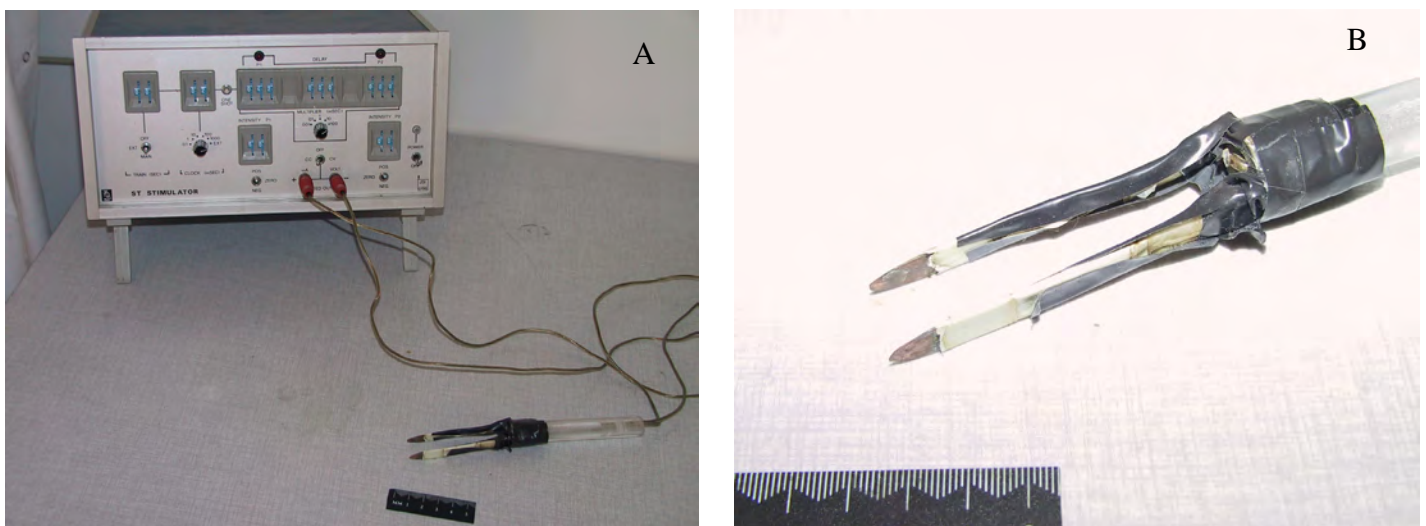
La technique du « maximal electroshock seizure-test » permet d'induire chez la souris des convulsions. Un électrochoc est délivré au moyen d'électrodes connectées à un stimulateur utilisant une constante de pulse de 60 Hz (**Figure 23**). Elles sont appliquées avec une intensité de courant de 50 mA pendant 20 millièmes de seconde. Les électrodes sont placées sur l'animal au niveau oculaire, plus précisément sur la cornée. Une goutte de sérum physiologique est placée dans les yeux pour assurer une bonne conduction du courant. Le liquide physiologique contient 0,4% d'Unicaïne® (oxybuprocaïne HCl 4 mg/mL) comme anesthésique local. Les souris non protégées développent une extension tonico-clonique des membres postérieurs correspondant aux convulsions.

Les composés à tester et celui de référence (topiramate) sont suspendus dans l'eau avec un équivalent de NaOH. Cette solution est injectée par voie intra-péritonéale 3 heures avant la stimulation à une dose unique de 30 mg/kg. Le volume injecté correspond à 3 mL/kg.

Chacun des 14 composés synthétisés sera étudié sur un groupe de six souris. Deux autres groupes de 6 souris serviront de contrôles négatif et positif. Le contrôle négatif est réalisé avec le topiramate et le contrôle positif, avec la solution d'injection seule.

Après la stimulation électrique, l'animal est replacé dans sa cage où son comportement est observé durant environ 5 minutes.

Après l'expérimentation, les souris sont euthanasiées au moyen de CO<sub>2</sub>.



**Figure 23 :** (A) Photographie de l'appareillage qui permet d'induire une stimulation électrique cornéenne. (B) Photographie de l'électrode cornéenne.



## **Chapitre 4: Résultats et discussions**



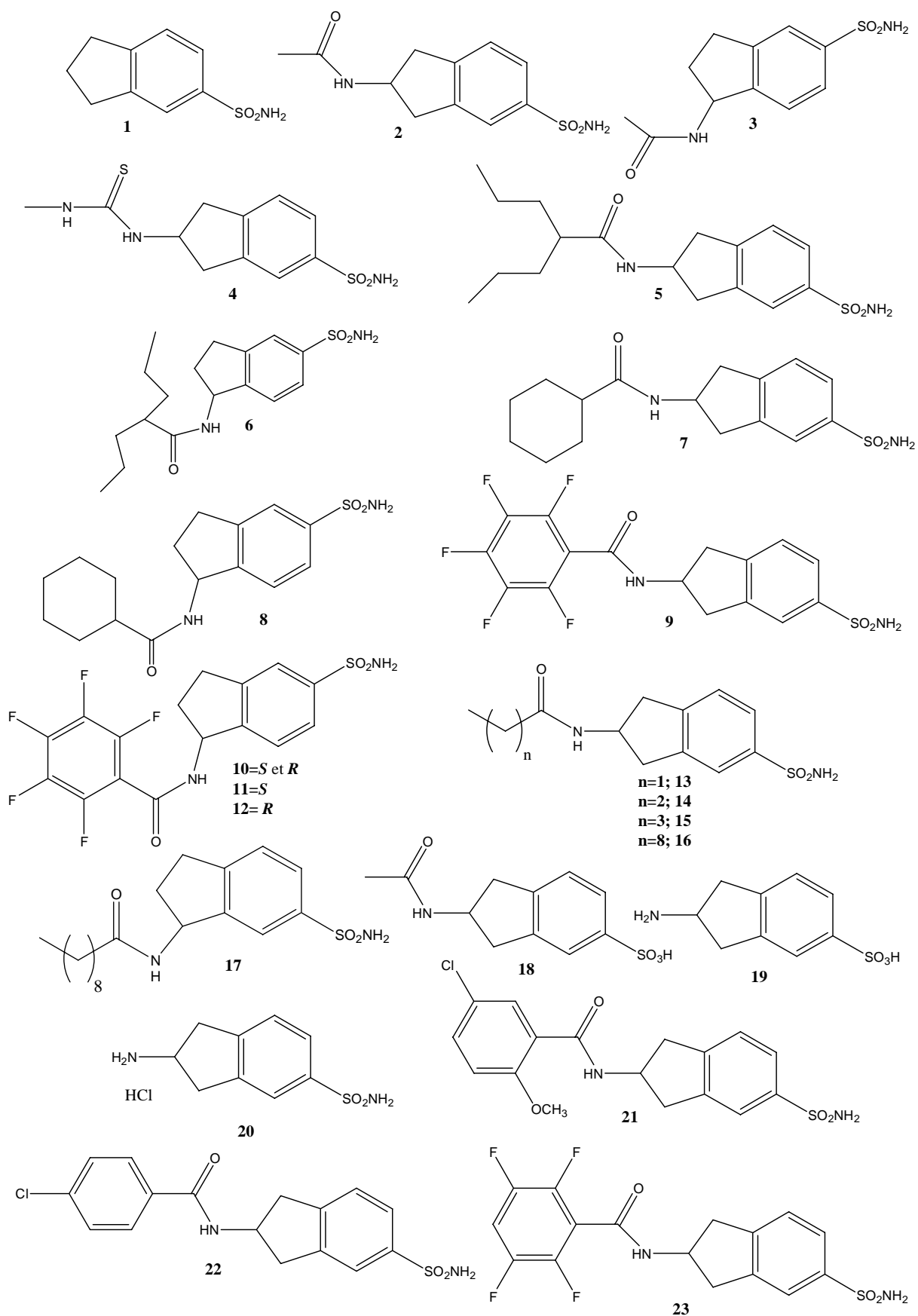
## Chapitre 4 : Résultats et discussions

### 4.1. Prérequis

Au cours d'un précédent criblage réalisé sur différents sulfonamides, le département de Pharmacie a montré que l'indane-5-sulfonamide (**1**, **Figure 24**) présentait un bon pouvoir inhibiteur sur l'AC I et II humaines avec des valeurs de  $K_i$  de 215 nM et 52 nM respectivement (Chazalette et al., 2004). Ce squelette a servi de base pour la conception de nouvelles molécules inhibitrices des ACs. Dans cette optique, des dérivés de l'indanesulfonamide ont été synthétisés au Département de Pharmacie (**Figure 24**) et se distinguent par la nature du résidu présent en position 1 ou 2 du noyau indane. Le lien reliant cette chaîne latérale au noyau indane peut être de type amide (CO-NH) ou thiourée (NH-CS-NH). Le choix de la chaîne latérale est basé sur de précédentes relations structure-activité (Masereel et al., 2002) où il a ainsi été démontré que les groupements de type méthyle, dipropylméthane (valproyle) ou pentafluorophényle favorisent l'inhibition des ACs. Toutes ces drogues présentent un groupement sulfonamide ( $\text{SO}_2\text{NH}_2$ ) ou une fonction acide sulfonique ( $\text{SO}_3\text{H}$ ) coordinateur du zinc présent dans le site actif de l'AC (voir point 1.1.4.). Cette liaison empêche ainsi la conversion de l'eau et du gaz carbonique en proton et ion bicarbonate.

Etant donné l'implication de l'AC IX dans le cancer et l'importance de cette pathologie en terme de santé publique, le Département de Pharmacie a évalué le pouvoir inhibiteur d'indanesulfonamides sur cette isoforme enzymatique (Thiry<sup>b</sup> et al., 2006). Parmi les dérivés d'indanesulfonamide examinés (composé **1-10**, **13-16** et **18-23**), certains (**10** et **16**) présentent un profil biologique intéressant sur l'AC IX, avec un pouvoir inhibiteur élevé vis-à-vis de l'AC IX ( $K_i$  de l'ordre de 3 nM), meilleur que la drogue de référence (acétazolamide). Ils possèdent également une bonne sélectivité par rapport aux deux isoformes physiologiquement pertinentes, AC I et II (Thiry<sup>b</sup> et al., 2006).

Chaque dérivé de l'indanesulfonamide synthétisé, contient le même pourcentage d'énantiomères *R* et *S*. Il s'agit donc du mélange racémique. Néanmoins, les deux énantiomères (*R* et *S*) contenus dans le mélange racémique du composé **10** ont été synthétisés séparément. En effet, ce composé présentait un profil biologique très intéressant sur l'AC IX (Thiry<sup>b</sup> et al., 2006).



**Figure 24** : Structure des dérivés de l'indanesulfonamide.



## 4.2. Evaluation biologique sur enzymes isolées

Afin d'évaluer le pouvoir inhibiteur de certains indanesulfonamides sur l'ACs, un stage a été réalisé à l'Université de Florence en mai 2006. Nous avons travaillé au sein du « Laboratorio di Chimica Inorganica e Bioinorganica » sous la direction du professeur Scozzafava et du docteur Supuran.

Au cours de ce travail, les dérivés de l'indanesulfonamide ont été évalués sur trois autres isoformes de l'AC : VII, XII, XIV. Nous avons ainsi pu déduire diverses relations structure-activité indispensables pour l'orientation de synthèses ultérieures afin d'obtenir des inhibiteurs plus actifs et sélectifs.

Pour rappel, l'AC XII constitue également une cible thérapeutique intéressante dans le domaine du cancer. L'évaluation sur AC XII des composés complètera les résultats antérieurs obtenus sur AC IX par le département de Pharmacie (Thiry<sup>b</sup> et al., 2006). Elles permettront ainsi de sélectionner des inhibiteurs sélectifs de ces deux isoformes. Ils pourront ainsi servir d'outil biochimique dans le cadre d'une meilleure compréhension de l'implication de ces deux isoformes dans le cancer.

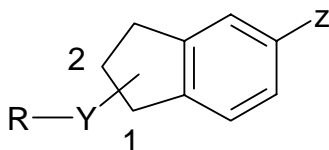
L'isoenzyme VII et XIV seraient quant à elles plus précisément impliquées dans l'étiologie des convulsions (Thiry<sup>a</sup> et al., 2006). L'évaluation du pouvoir inhibiteur des composés sur ces isoformes permettra de mettre en évidence les molécules les plus actives sur ces deux isoenzymes qui seront par la suite testés sur un modèle *in vivo* de convulsions. Ainsi, nous pourrions mieux comprendre le rôle des ACs dans l'étiologie des convulsions.

### 4.2.1. Test enzymatique

Le principe de la détermination du pouvoir inhibiteur des indanesulfonamides est basé sur la réaction catalysée par l'anhydrase carbonique. Pour rappel, cette enzyme permet l'hydratation du dioxyde de carbone en acide carbonique en anion bicarbonate et proton (**Équation 1**). Elle participe ainsi à une acidification du milieu qui peut être facilement mise en évidence par l'utilisation d'un indicateur coloré.

La réaction d'hydratation est suivie au moyen d'un appareil de type stop-flow couplé à un détecteur UV-Visible. Cet appareil permet de suivre avec précision le début de la réaction enzymatique afin d'évaluer sa vitesse initiale. Ces vitesses sont déterminées en absence d'inhibiteur et en présence de cinq concentrations en inhibiteurs ( $10^{-4}$ M à  $10^{-8}$ M) pour déterminer le pourcentage d'activité résiduelle en enzyme. Les pourcentages d'activité résiduelle sont reportés graphiquement en fonction de la concentration en inhibiteur afin d'évaluer l'IC<sub>50</sub> qui correspond à 50% de l'activité résiduelle de l'enzyme. Les K<sub>i</sub> sont calculés à partir des IC<sub>50</sub> en utilisant l'équation de Cha (Cha, 1975).

**Tableau 6 :** Pouvoir inhibiteur des dérivés de l'indanesulfonamide sur les AC VII, XII et XIV.



Composés	Y	Position	R	Z	K <sub>i</sub> (nM) AC XII	K <sub>i</sub> (nM) AC XIV	K <sub>i</sub> (nM) AC VII
<b>AZA</b>					5,7	41	2,5
<b>1</b>					0,39	6,5	5,1
<b>2</b>	CO-NH	2	Méthyle	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	5,4	675	10
<b>3</b>	CO-NH	1	Méthyle	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	0,32	842	1,7
<b>4</b>	NH-CS-NH	2	Méthyle	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	3,0	41	0,65
<b>5</b>	CO-NH	2	Valproyle	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	28	658	9,3
<b>6</b>	CO-NH	1	Valproyle	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	6,2	251	1,7
<b>7</b>	CO-NH	2	Cyclohexyle	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	9,1	48	0,78
<b>8</b>	CO-NH	1	Cyclohexyle	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	2,8	341	8,2
<b>9</b>	CO-NH	2	Pentafluorophényle	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	2,3	24	6,8
<b>10</b>	CO-NH	1	Pentafluorophényle	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	5,5	7,3	1,9
<b>11</b>	CO-NH	1S	Pentafluorophényle	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	6,0	38	1,7
<b>12</b>	CO-NH	1R	Pentafluorophényle	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	1,0	106	3,3
<b>13</b>	CO-NH	2	Ethyle	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	9,0	61	3,9
<b>14</b>	CO-NH	2	Propyle	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	5,9	5,0	4,5
<b>15</b>	CO-NH	2	Butyle	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	52	40	6,5
<b>16</b>	CO-NH	2	Nonyle	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	0,69	2,2	1,9
<b>17</b>	CO-NH	1	Nonyle	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	5,7	1030	1,5
<b>18</b>	CO-NH	2	Méthyle	SO <sub>3</sub> H	4,7	68	7,1
<b>19</b>	-	2	NH <sub>2</sub>	SO <sub>3</sub> H	4,8	82	8,0
<b>20</b>	-	2	NH <sub>2</sub>	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	1,4	5,8	1,6
<b>21</b>	CO-NH	2	Parachlorophényle	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	0,36	5,6	2,7
<b>22</b>	CO-NH	2	Métachloropara- métoxyphényle	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	0,44	2,7	1,5
<b>23</b>	CO-NH	2	Tétrafluorophényle	SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	3,1	0,47	3,7

## 4.2.2. Résultats biologiques

Les  $K_i$  obtenus pour les dérivés de l'indanesulfonamide synthétisés sont indiqués dans le **Tableau 6**. L'acétazolamide (**AZA**) a été choisi comme drogue de référence et permettra d'évaluer l'efficacité des composés testés. Le noyau indane-5-sulfonamide (**1**) utilisé comme base pour la synthèse des composés testés présente un pouvoir inhibiteur élevé vis-à-vis des 3 isoformes enzymatiques étudiées.

De manière générale, les dérivés de l'indanesulfonamide inhibent l'AC XII avec des  $K_i$  compris entre 0,32 nM pour le plus actif (**3**) et 52 nM (**15**) pour le moins actif. Ils présentent également un très bon pouvoir inhibiteur sur l'AC VII avec des valeurs de  $K_i$  qui s'échelonnent de 0,65 nM (**4**) à 10 nM (**2**). Par contre, certains composés semblent avoir un pouvoir inhibiteur légèrement moins important sur l'AC XIV avec certains  $K_i$  atteignant des valeurs supérieures à 100 nM (**3, 5, 6, 8, 12, 17**).

### 4.2.2.1. AC XII

La majorité des composés testés présentent un pouvoir inhibiteur meilleur ou identique à la drogue choisie comme référence.

Diverses relations structure-activité peuvent être déduites à partir du **Tableau 6**. L'analyse des  $K_i$  obtenus avec l'isoenzyme XII nous montre qu'un groupement méthyle relié au noyau indane par un lien amide (**2**) ou thiourée (**4**) donne des valeurs de  $K_i$  similaires. Néanmoins, la position de substitution du méthyle sur l'indane-5-sulfonamide influence le pouvoir inhibiteur du composé. Ce groupement substitué en position 1 est plus actif (**3**) que son isomère en position 2 (**2**).

Substituer le noyau indane en position 1 (**6**) par un groupement valproyle donne un meilleur pouvoir inhibiteur que lorsqu'il est présent en position 2. Un groupement cyclohexyle substitué en position 1 (**8**) donne également un meilleur pouvoir inhibiteur que son régioisomère en position 2 (**7**). Un groupement pentafluorophényle confère au composé une bonne action inhibitrice et sa position de substitution sur le noyau indane semble avoir peu d'importance (**9-10**). Le groupement tétrafluorophényle (**23**) présente la même activité inhibitrice que le groupement pentafluorophényle.

Le composé **12**, énantiomère *R* de **10**, présente un très bon pouvoir inhibiteur avec un  $K_i$  de 1 nM. Par contre, l'énantiomère *S* (**11**) est beaucoup moins actif avec un  $K_i$  de 6 nM. Cependant, le mélange racémique (**10**) possède un  $K_i$  de 5,5 nM.

L'ajout d'une chaîne carbonée de deux ou trois carbones permet d'obtenir des valeurs similaires de constante d'inhibition (**13-14**). Nous remarquons avec surprise que l'allongement de cette chaîne avec 1 carbone supplémentaire (**15**) augmente fortement le  $K_i$  et diminue ainsi le pouvoir inhibiteur du composé.

Cependant, une chaîne de 9 carbones substituée en position 2 sur le noyau indane (**16**), nous permet d'atteindre un  $K_i$  très faible de 0,69 nM. La présence de cette longue chaîne en position 1 (**17**) diminue son pouvoir inhibiteur.

Les composés **18** et **19** présentent la particularité de posséder une fonction acide sulfonique ( $\text{SO}_3\text{H}$ ) et non un sulfonamide. Cette fonction acide sulfonique permet tout de même d'atteindre des valeurs de  $K_i$  semblables à celle observée en utilisant la drogue de référence. La fonction sulfonamide ou acide sulfonique semble conférer au composé le même pouvoir inhibiteur (**2-18** et **19-20**).

Enfin, malgré leurs différences structurales, les composés **21** et **22**, présentent la même capacité inhibitrice.



#### 4.2.2.2. AC XIV

L'acétazolamide de référence est moins actif vis-à-vis de cette isoforme. Le comportement des inhibiteurs envers l'AC XIV semble être différent de celui précédemment observé avec l'AC XII (**Tableau 6**).

La position de substitution 1 (**3**), ou 2 (**2**) du groupement méthyle sur le noyau indane n'influence pas le pouvoir inhibiteur du composé envers l'AC XIV. Un groupement cyclohexyle substitué en position 2 (**7**) donne un meilleur pouvoir inhibiteur que son régioisomère en position 1 (**8**). Un pentafluorophényle confère également au composé un bon pouvoir inhibiteur (**9-10**). Dans ce cas, la position de substitution de ce groupement a de l'importance: la position 1 est la plus favorable (**10**). En ce qui concerne les énantiomères *R* et *S* du composé **10** (**11-12**), nous observons que l'énantiomère *S* confère un meilleur pouvoir inhibiteur au composé. Lorsque les deux énantiomères sont ensemble (**10**), on obtient une valeur de  $K_i$  plus faible qu'avec les énantiomères séparés. Le composé **23** dispose d'une activité inhibitrice importante vis-à-vis de l'AC XIV ( $K_i$  : 0,47 nM). Cette drogue présente un groupement tétrafluorophényle apparemment plus favorable qu'un pentafluorophényle pour l'inhibition de l'AC XIV.

La présence d'une fonction acide sulfonique semble dans certain cas favoriser l'inhibition (**2-18**), et dans d'autres cas cette fonction rend le composé moins actif que le sulfonamide (**19-20**).

Les composés **21** et **22** présentent un pouvoir inhibiteur similaire.

Quelques relations structure-activité sont semblables à celles précédemment déterminées envers l'AC XII.

Le lien thiourée (**4**) donne des valeurs de  $K_i$  nettement inférieures au lien amide. Le lien thiourée favorise ainsi le pouvoir inhibiteur du composé.

La substitution du noyau indane en position 1 (**6**) par un groupement valproyle donne un meilleur pouvoir inhibiteur que son régioisomère (**5**).

L'allongement (en position 2) de la chaîne latérale (**13-16**) favorise également l'augmentation du pouvoir inhibiteur du composé envers l'AC XIV. Cependant, l'ajout d'un groupement butyle fait exception à cette règle. La substitution d'une chaîne de 9 carbones en position 2 (**16**) se révèle nettement plus active que son régioisomère (**17**).

#### 4.2.2.3. AC VII

Les dérivés de l'indanesulfonamide sont d'excellents inhibiteurs de l'AC VII. En effet, les composés testés présentent un très bon pouvoir inhibiteur avec des constantes d'inhibition ne dépassant pas 10 nM.

La position de substitution de la chaîne latérale sur le noyau indane nous donne quelques informations intéressantes. La substitution d'un groupement méthyle en position 1 (**3**) est favorable pour l'activité inhibitrice du composé.

Contrairement à ce qui a été précédemment énoncé, le lien de type thiourée (**4**) améliore dans ce cas l'effet inhibiteur de ce dérivé d'indanesulfonamide. En effet, lorsque la drogue présente un lien de type amide (**2**), la constante d'inhibition atteint une valeur environ dix fois supérieure ( $K_i$  : 10 nM) à celle obtenue lorsque le lien est de type thiourée (**4**) ( $K_i$  : 0,65 nM).

Un groupement valproyle substitué en position 1 (**6**) est plus actif que son régioisomère en position 2 (**5**). Substituer le noyau indane en position 2 par un cyclohexyle (**7**) donne un pouvoir inhibiteur nettement supérieur.

Pour le groupement pentafluorophényle, la position 1 doit être privilégiée. Lorsque l'on dissocie les énantiomères du mélange racémique (**10**), l'énantiomère *S* est le plus actif (**11**).



A nouveau, nous observons qu'en position 2 un groupement tétrafluorophényle (**23**) permet d'atteindre un pouvoir inhibiteur plus élevé que le pentafluorophényle (**9**).

Un groupement éthyle (**13**) ou propyle (**14**) confère la même propriété inhibitrice. Avec le groupement butyle (**15**), les  $K_i$  obtenus sont toujours légèrement plus élevés. On obtient des valeurs de  $K_i$  de 1,9 nM lorsque la chaîne carbonée contient 9 carbones (**15**). La position de substitution de cette chaîne n'a pas d'importance sur cette isoforme.

Les composés **21** et **22**, présentent la même activité.

La présence d'une fonction acide sulfonique semble dans certain cas favoriser l'inhibition (**2-18**), et dans d'autres cas cette fonction rend le composé moins actif que le sulfonamide (**19-20**). Ces résultats sont difficilement interprétables.

#### 4.2.2.4. Conclusions

Une très grande majorité des composés testés présentent un excellent pouvoir inhibiteur envers l'AC XII, XIV et VII, avec certaines valeurs de constantes d'inhibition inférieures à 10 nM. Ils présentent ainsi un pouvoir inhibiteur meilleur ou identique à celui de la drogue choisie comme référence (**AZA**).

Pour les isoformes VII et XII, un lien thiourée améliore l'activité inhibitrice du dérivé indanesulfonamide. Cependant, pour l'AC VII, ces deux types de lien confèrent au composé le même pouvoir inhibiteur.

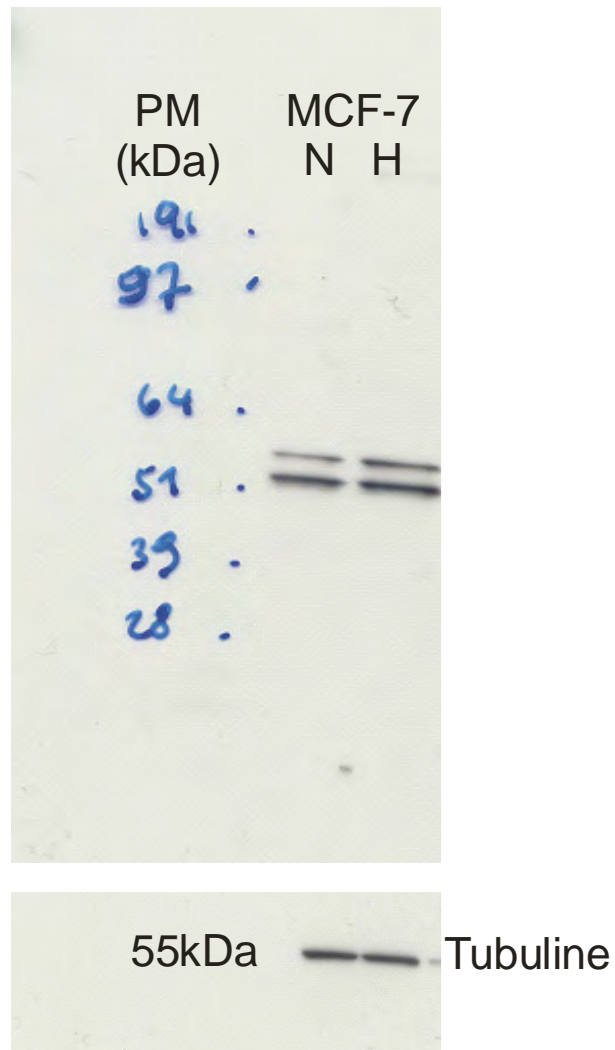
L'étude de la position de substitution de la chaîne latérale sur le noyau indanesulfonamide a montré que nous ne pouvions pas privilégier la position 1 plutôt que la position 2 ; l'activité inhibitrice varie en fonction du type d'enzyme et de la nature de la chaîne latérale.

Une chaîne latérale de type tétrafluorophényle a une capacité inhibitrice identique (AC XII) ou plus élevée (AC VII et XIV) au pentafluorophényle.

L'allongement de la chaîne latérale favorise l'augmentation du pouvoir inhibiteur envers les trois isoformes étudiées (XII, XIV, VII). Par contre, les  $K_i$  obtenus avec une chaîne butyle sont toujours plus élevés.

La séparation des énantiomères donne des résultats divergents : pour les isoformes VII et XIV, l'énantiomère *S* est plus actif, et pour l'AC XII, c'est la forme *R* qui améliore l'activité inhibitrice.

Le comportement des inhibiteurs est différent vis-à-vis des trois isoformes enzymatiques étudiés et peut éventuellement être attribué aux caractéristiques structurales du site actif des différentes isoenzymes.



**Figure 25 :** Western Blot réalisé sur un gel de type NuPAGE® 4-12%, tampon MOPS. Le lysat cellulaire a été obtenu avec un tampon de lyse à l'urée.



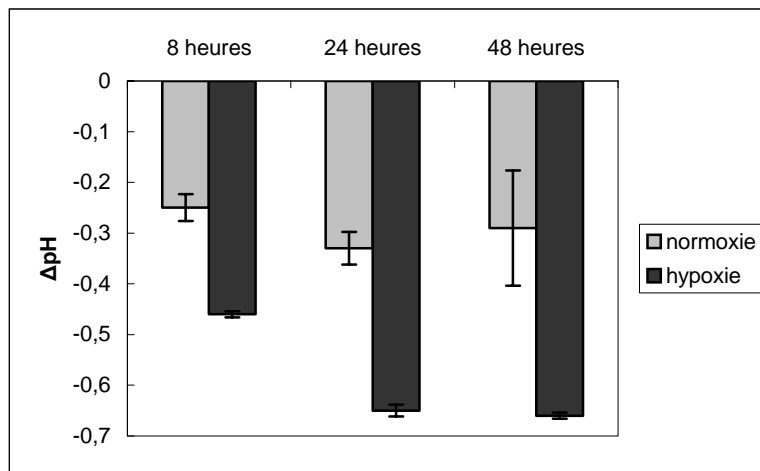
### 4.3. Evaluation biologique sur un modèle *in vitro*

L'AC de type IX est associée au cancer depuis la découverte de sa surexpression dans les cellules tumorales (Zavada et al., 1993). Cette isoforme est exprimée dans de nombreux tissus tumoraux et est absente de la plupart des tissus sains (Pastoreková and Pastorek, 2004). L'hypoxie présente dans l'environnement extratumoral, par l'intermédiaire du facteur HIF-1 (Hypoxia Inductible Factor-1), induit une surexpression de l'AC IX. Cette enzyme joue un rôle dans la croissance et la survie des cellules tumorales (Robertson et al., 2004). L'AC IX fournit les anions bicarbonates utilisés comme substrat dans diverses réactions biosynthétiques indispensables à la croissance cellulaire (Chegwidden et al., 2000). Par son activité catalytique, l'AC IX permet une acidification du milieu extratumoral qui contribue à l'acquisition de phénotypes métastatiques et à une mauvaise résorption des bases faibles cytotoxiques couramment utilisées en chimiothérapie (Stubbs et al., 2000).

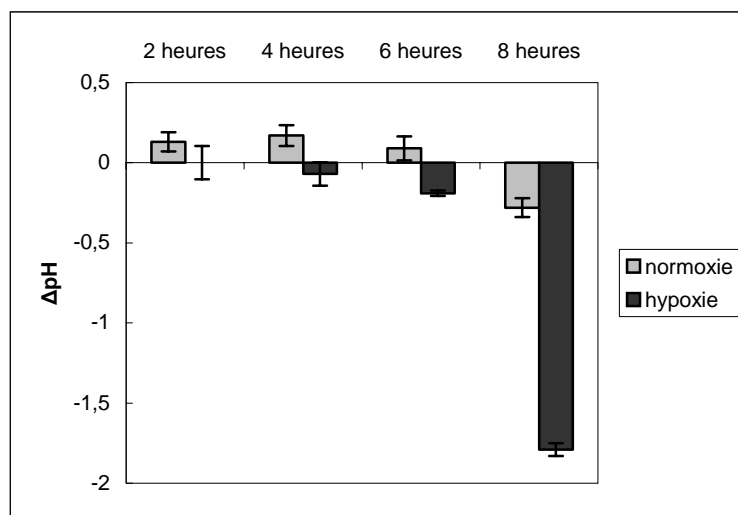
L'AC IX semble ainsi contribuer par de multiples mécanismes, à la physiopathologie du cancer. Son inhibition ciblée présente de nombreuses perspectives thérapeutiques.

Les résultats enzymologiques concluant sur l'AC IX, nous ont mené à évaluer ces indanesulfonamides sur un modèle cellulaire *in vitro* exprimant cette isoforme enzymatique. Le choix de la lignée cancéreuse utilisée a été réalisé sur base de la littérature. En fonction des types cellulaires présents dans l'Unité de Recherche de Biologie Cellulaire (URBC) et des informations récemment publiées (Kaluzova et al., 2004), nous nous sommes axés sur le type cellulaire MCF-7. Il s'agit de cellules épithéliales adhérentes, permanentes et issues d'un adénocarcinome mammaire. La technique du western blot a permis de confirmer à l'aide d'anticorps spécifiques la présence de la protéine d'intérêt (AC IX) (**Figure 25**).

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'AC IX participe entre autre à l'acidification du pH extratumoral. Nous voulons déterminer si un inhibiteur de l'AC IX permet de moduler ces variations de pH. Pour ce faire, nous nous sommes basés sur un protocole expérimental mis au point par l'équipe de Svastova (Svastova et al., 2004). Les cellules sont incubées pour des durées variables en normoxie et en hypoxie en présence ou en absence d'inhibiteurs d'AC IX. Le pH du milieu extracellulaire est mesuré à l'aide d'une microélectrode. Les résultats sont exprimés sous forme de gradient de pH ( $\Delta\text{pH}$ ). Une acidification du milieu extracellulaire se traduit par un  $\Delta\text{pH}$  négatif; plus ce  $\Delta\text{pH}$  est négatif et plus l'acidification du milieu extracellulaire est importante. Un effet de la drogue se démontre par une diminution du  $\Delta\text{pH}$ .



**Figure 26 :** Graphique montrant l'acidification du milieu extracellulaire en incubant les cellules avec du milieu CO<sub>2</sub> indépendant.



**Figure 27 :** Graphique montrant l'acidification du milieu extracellulaire en incubant les cellules avec le milieu « maison ».

### 4.3.1. Acidification du milieu extracellulaire et détermination de la viabilité cellulaire

Nous avons dans un premier temps, déterminé si les cellules étaient capables d'acidifier le milieu extracellulaire en normoxie et en hypoxie en présence de deux milieux non tamponnés: milieu CO<sub>2</sub> indépendant et milieu de culture « maison ». Il est en effet indispensable de travailler avec ce type de milieu non tamponné afin de mettre en évidence une variation de pH lors des diverses conditions étudiées. Les périodes d'incubation des cellules sont de 8, 24 et 48 heures pour le milieu CO<sub>2</sub> indépendant et 2, 4, 6 et 8 heures pour le milieu de culture « maison ». Elles permettront d'évaluer quelles sont les périodes d'incubation optimales en hypoxie et en normoxie, pour mettre en évidence l'acidification du milieu extracellulaire

Nous avons également effectué en parallèle un test de viabilité cellulaire, afin de choisir les temps d'incubation les mieux tolérés par les cellules. La détermination au préalable des durées d'incubation en hypoxie et en normoxie qui peuvent être acceptées par les cellules est obligatoire.

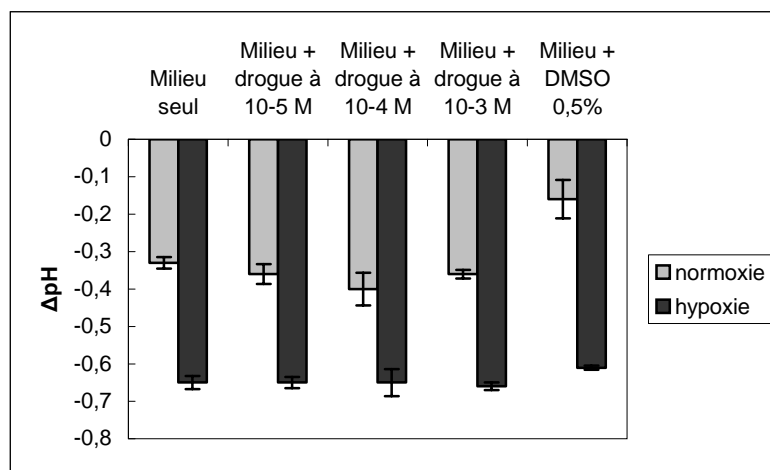
Les résultats obtenus lors de l'utilisation du milieu CO<sub>2</sub> indépendant sont représentés à la **Figure 26**. Lorsque les cellules sont incubées en hypoxie, nous observons bien une acidification du milieu extracellulaire. A partir de 24 heures l'acidification du milieu augmente fortement. Cette acidification est également présente en incubant les cellules sous normoxie. Cependant, elle est moins importante.

L'analyse de la viabilité cellulaire avec le test au bromure d'éthidium et à l'acridine orange a montré que les cellules incubées durant 48 heures présentaient une mortalité importante. Environ 60% des cellules n'ont pas survécu à cette mise sous normoxie, et en condition hypoxique, les cellules n'étaient plus adhérentes. La viabilité cellulaire pour les autres périodes d'incubation atteignait 100%.

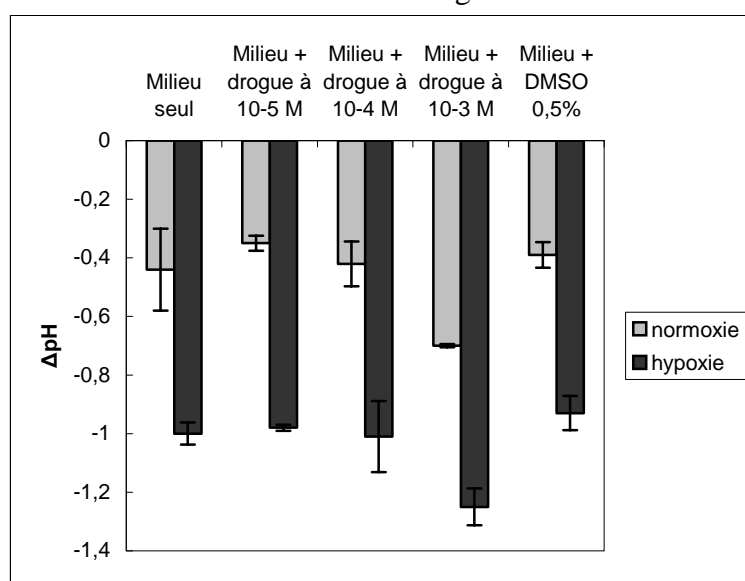
Ces résultats permettent de conclure qu'une incubation durant 24 heures dans un milieu CO<sub>2</sub> indépendant est la plus appropriée pour la mise en évidence de l'acidification du milieu extratumoral. Au-delà de cette période d'incubation, la mortalité cellulaire est trop importante et les résultats obtenus ne peuvent être validés.

Les mêmes séries d'expériences ont été réalisées en utilisant un milieu de culture « maison ». Les périodes d'incubation testés sont de 2, 4, 6 et 8 heures. Les résultats obtenus sont représentés à la **Figure 27**. On observe bien une augmentation progressive de l'acidification du milieu extracellulaire lors de l'allongement de la période d'incubation. La valeur du  $\Delta\text{pH}$  obtenu avec le milieu de culture « maison » atteint -1,79 unités après une période d'incubation de 8 heures. L'acidification du milieu extracellulaire en présence du milieu de culture CO<sub>2</sub> indépendant n'est pas si importante, puisque le  $\Delta\text{pH}$  ne dépassait pas -0,46 unités. Nous pouvons dès lors conclure que pour une période d'incubation en hypoxie identique, l'acidification du milieu de culture extracellulaire est plus importante avec le milieu « maison » qu'avec le milieu CO<sub>2</sub> indépendant.

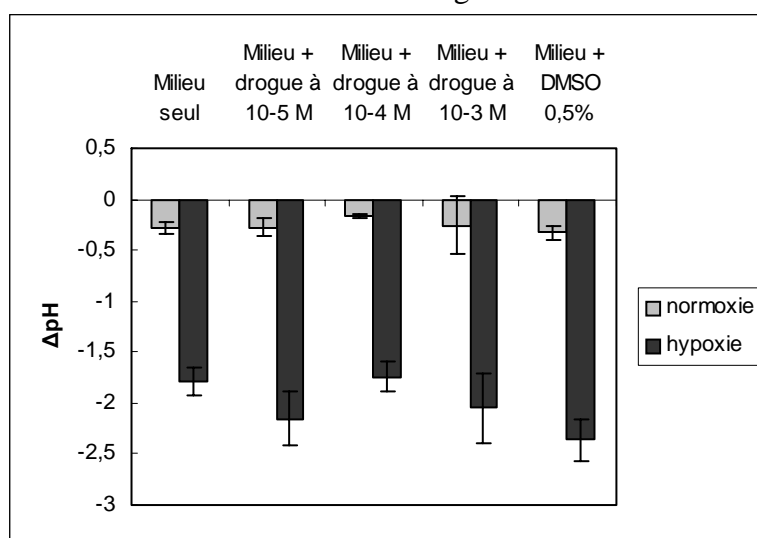
Le test de viabilité cellulaire effectué en parallèle avec le bromure d'éthidium et l'acridine orange, a permis de mettre en évidence qu'une incubation de 8 heures en hypoxie ou en normoxie représentait la période optimale pour une mise en évidence de l'acidification du milieu extracellulaire. Lors de cette période d'incubation la mortalité cellulaire atteint 3 % en condition hypoxique et est inférieure à 1 % en normoxie.



**Figure 28 :** Incubation des cellules dans du milieu  $CO_2$  indépendant durant 24 heures avec la drogue de référence.



**Figure 29 :** Incubation des cellules dans du milieu « maison » durant 8 heures avec la drogue de référence.



**Figure 30 :** Incubation des cellules dans du milieu « maison » durant 8 heures avec l'acétazolamide (AZA).

### 4.3.2. Incubation avec un inhibiteur d'AC

Les périodes d'incubation optimales ayant préalablement été déterminées (24 heures pour le milieu CO<sub>2</sub> indépendant et 8 heures pour le milieu de culture « maison »), nous avons investigué l'effet d'un inhibiteur d'AC IX sur les MCF-7 exprimant cette isoforme enzymatique.

Juste avant la mise sous hypoxie et normoxie, le milieu de culture est remplacé par 1 mL de milieu CO<sub>2</sub> indépendant ou 1 mL de milieu « maison » contenant soit, une drogue de référence soit, le composé **10** (**Figure 24**) à 3 concentrations (10<sup>-3</sup>M, 10<sup>-4</sup>M ou 10<sup>-5</sup>M).

Les drogues de référence sont le 4-(2-aminoethyl)-benzensulfonamide (**Figure 22**) et l'acétazolamide (**Figure 18**). Le premier composé est un bon inhibiteur de l'AC IX (K<sub>i</sub> : 36 nM). Cette drogue présente également une certaine sélectivité vis-à-vis de l'AC II cytoplasmique et de l'AC IV exprimé en membrane plasmique. Elle est également utilisée à différentes concentrations sur culture cellulaire par l'équipe de Svastova lors d'expériences similaires à celles-ci (Svastova et al., 2004). Cette équipe a démontré que cette drogue permet d'empêcher l'acidification du milieu extracellulaire lors d'une incubation sous hypoxie durant 48 heures.

Le composé **10**<sup>1</sup> présentait lors du criblage sur enzyme isolée un profil biologique intéressant, se caractérisant par un pouvoir inhibiteur élevé vis-à-vis de l'AC IX avec un K<sub>i</sub> de l'ordre de 3 nM ainsi qu'une bonne sélectivité par rapport aux AC I et II (Thiry et al., 2006).

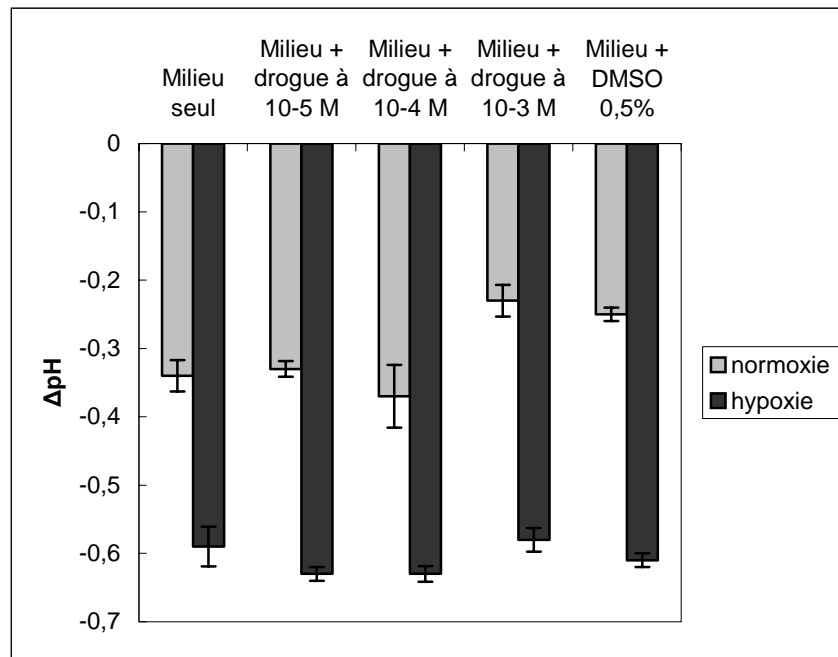
Les résultats obtenus après une période de 24 heures d'incubation en normoxie ou en hypoxie en présence de la drogue de référence sont représentés graphiquement ci-contre (**Figure 28**). Le milieu utilisé est le milieu CO<sub>2</sub> indépendant.

Les mêmes expériences ont été réalisées en utilisant le milieu de culture maison. Les résultats obtenus après une période de 8 heures d'incubation en normoxie et hypoxie en présence de la drogue de référence sont représentés graphiquement ci-contre (**Figure 29**). Nous obtenons des résultats similaires avec les deux types de milieux. La drogue utilisée comme référence ne semble avoir aucun effet sur l'acidification du milieu extracellulaire, même à une concentration élevée de 10<sup>-3</sup>M. Elle n'induit aucune augmentation du pH au niveau du milieu. De plus, l'utilisation du milieu « maison », induit une acidification encore plus importante lors d'une incubation de la drogue de référence à une concentration de 10<sup>-3</sup>M.

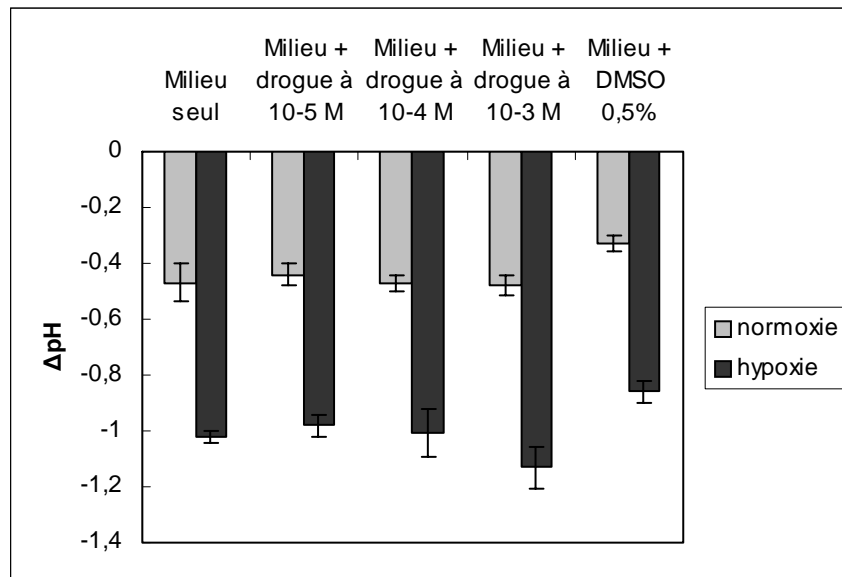
Le DMSO utilisé pour la solubilisation du composé de référence semble avoir une influence minime sur l'acidification et induit une légère diminution au niveau du gradient de pH.

Une expérience similaire à celle-ci a été réalisée en utilisant une autre drogue de référence, à diverses concentrations : l'acétazolamide (**AZA**). Ce composé est utilisé en clinique et présente un pouvoir inhibiteur important vis-à-vis de l'AC IX avec un K<sub>i</sub> de l'ordre de 25 nM. Les résultats obtenus après une période de 8 heures d'incubation en normoxie et hypoxie en présence de l'**AZA** sont représentés graphiquement ci-contre (**Figure 30**). Le milieu utilisé est le milieu de culture « maison ». Les résultats obtenus lors d'une incubation de 8 heures avec l'autre drogue de référence, l'acétazolamide, sont ainsi identiques à ceux précédemment obtenus avec le composé 4-(2-aminoethyl)-benzensulfonamide. L'inhibiteur d'AC IX utilisé ne semble avoir aucun effet sur l'acidification du milieu extracellulaire.

<sup>1</sup> Les expériences de mise au point effectuées avec les drogues de référence n'ayant pas donné de résultats concluants, nous avons préféré ne pas étudier le composé **10** étant donné que nous disposons d'une faible quantité de ce produit.



**Figure 31 :** Incubation des cellules dans du milieu CO<sub>2</sub> indépendant *overnight* avec la drogue de référence.



**Figure 32 :** Incubation des cellules dans du milieu « maison » *overnight* avec la drogue de référence.

### 4.3.3. Incubation overnight avec un inhibiteur d'AC

Les expériences précédentes mises au point avec une simple incubation des drogues de référence (4-(2-aminoethyl)-benzensulfonamide et acétazolamide) pour de courtes périodes de 8 et 24 heures en fonction du milieu utilisé n'ont pas donné de résultats concluants. Aucune influence de la drogue sur le milieu extracellulaire n'a pu être mise en évidence. Par conséquent, nous avons entrepris d'incuber la drogue au contact de la culture cellulaire, durant la nuit (*overnight*) précédant la mise sous hypoxie dans le but de potentialiser l'effet inhibiteur de la drogue. Seul le 4-(2-aminoethyl)-benzensulfonamide a été testé dans cette série d'expérience.

Les résultats obtenus avec les deux types de milieux sont représentés graphiquement ci-contre (**Figure 31, Figure 32**). La préincubation de la drogue *overnight* n'a pas donné de résultats concluants. L'acidification du milieu extracellulaire est toujours aussi importante. Une inhibition ciblant l'AC IX exprimé sur ces cellules ne semble pas avoir d'effet sur l'acidification cellulaire.

### 4.3.4. Conclusions

Nous avons réalisé une série d'expériences visant à mettre en évidence l'effet d'inhibiteurs d'AC IX sur l'acidification du milieu extratumoral. Nous avons effectué ces expériences avec deux milieux de culture non tamponnés (milieu CO<sub>2</sub> indépendant et milieu de culture « maison »).

Dans un premier temps, la drogue a simplement été mise en contact avec la monocouche cellulaire pour des courtes durées de 8 et 24 heures en fonction du milieu utilisé. Ensuite, afin de potentialiser l'effet inhibiteur des composés, nous avons incubé les drogues en présence de la culture cellulaire, la nuit précédant la mise sous hypoxie et normoxie (incubation *overnight*). Cependant, nos expériences n'ont pas permis de mettre en évidence un effet des inhibiteurs d'AC IX sur l'acidification du milieu extracellulaire. Néanmoins, nous ne pouvons pas conclure qu'un inhibiteur d'AC IX n'induit pas de modulation des  $\Delta$ pH observés. En effet, le protocole utilisé peut être validé, étant donné que nous ne disposons pas de contrôle positif, la drogue utilisée comme référence ne produit aucun effet sur l'acidification du milieu extracellulaire. Pour rappel, cette même drogue avait été utilisée par l'équipe de Svastova (Svastova et al., 2004). Elle leur avait permis de démontrer des modulations de pH sur un autre type cellulaire que celui utilisé par notre équipe. Leurs expériences ont été menées sur des cellules de type MDCK (*Madin-Darby canine kidney epithelial cells*) qui n'expriment pas de façon endogène la protéine enzymatique AC IX. Ces cellules sont transfectées de façon stable afin d'induire une expression constitutive de la protéine AC IX humaine. Cette transfection permet ainsi l'expression d'une grande quantité de protéine. Dans notre cas, le western blot réalisé par le Département de Pharmacie a bel et bien démontré que les cellules MCF-7 expriment l'AC IX. Cependant, son expression n'est éventuellement pas suffisante pour induire une acidification du milieu extracellulaire.

Notre protocole s'est basé sur celui de l'équipe de Svastova mais diffère sur quelques points. En effet, l'équipe de Svastova et ses collaborateurs utilisent un milieu de culture classique et un incubateur spécialisé (incubateur Napco 7000 ; 2% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>, équilibré avec du N<sub>2</sub>) qui permet de mettre les cellules sous hypoxie pour des périodes beaucoup plus importantes, pouvant atteindre 48 heures avec un taux d'O<sub>2</sub> contrôlé. Ces longues périodes d'incubation





n'altèrent pas la viabilité cellulaire et permettent à l'inhibiteur d'exercer son action plus longtemps. Les milieux de culture utilisés par notre équipe (milieu CO<sub>2</sub> indépendant et milieu « maison ») lors de la mise sous hypoxie ou normoxie ne permettent pas de longues périodes d'incubation. Celles-ci ne peuvent dépasser 24 heures pour le milieu CO<sub>2</sub> indépendant et 8 heures pour le milieu de culture « maison ». Les durées d'incubation que nous utilisons ne sont peut-être pas optimales pour la mise en évidence de l'effet de l'inhibiteur. Cependant, elles ne peuvent être prolongées sous risque de nuire à la viabilité cellulaire.

Les MCF-7 utilisées proviennent d'un adénocarcinome mammaire. Ce type de cancer se caractérise par sa grande capacité à induire la formation de métastases dans les tissus environnants. L'acidification du milieu extracellulaire est en grande partie responsable de ces formations métastatiques par activation de diverses protéases intervenant dans la digestion de la matrice extracellulaire. Cette diminution de pH favorise également la perte de l'intégrité des jonctions intercellulaires. Ces étapes étant préliminaires au processus d'invasion. De multiples moyens sont mis en œuvre par ces cellules afin d'acidifier le milieu extracellulaire et de faciliter leur infiltration dans d'autres tissus sains.

L'équipe de Montcourrier (Montcourrier et al., 1997) a démontré que les cellules MCF-7 présentent une surexpression de pompes à protons ATP-dépendantes au niveau de la membrane plasmique. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de ce type de pompe (bafilomycine) a contribué à diminuer l'acidification extratumoral des cellules MCF-7.

Il a aussi été démontré que l'acidification du milieu extracellulaire des MCF-7 provenait d'une activité glycolytique importante. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur du transporteur d'acide lactique induit une diminution de cette acidité extracellulaire de l'ordre de 40 à 50 %.

Une autre hypothèse est émise quant à l'acidification du milieu extracellulaire des MCF-7. Les cellules provenant d'un adénocarcinome mammaire partageraient certaines caractéristiques communes avec les macrophages. En effet, elles contiendraient une grande quantité de phagosomes responsables d'une acidification intracellulaire. Ces protons peuvent ensuite diffuser dans le milieu extracellulaire.

Par conséquent, l'acidité observée au niveau du milieu extracellulaire des cellules MCF-7 n'est probablement pas uniquement liée à la surexpression de la protéine enzymatique AC IX. Etant donné les multiples mécanismes d'acidification des MCF-7, ce type cellulaire semble inapproprié pour mettre en évidence des modulations de pH<sub>e</sub> avec un inhibiteur d'AC IX.

**Tableau n°7** : Résultats de l'évaluation *in vivo* des composés par MES-test.

<b>Composés</b>	<b>% de souris protégées n=6</b>
<b>Contrôle positif</b>	0
<b>Contrôle négatif</b>	83
<b>1</b>	83
<b>3</b>	75
<b>4</b>	67
<b>6</b>	58
<b>7</b>	50
<b>8</b>	67
<b>10</b>	92
<b>11</b>	75
<b>12</b>	75
<b>13</b>	83
<b>14</b>	50
<b>15</b>	75
<b>16</b>	75
<b>17</b>	83

#### 4.4. Maximal electroshock seizure : MES-test

Les composés synthétisés présentant, au cours du criblage sur enzyme isolée, un profil biologique intéressant envers l'AC VII et XIV ont été testés sur un modèle de convulsions *in vivo*. Pour rappel, ces deux isoformes enzymatiques semblent être impliquées dans la physiopathologie des convulsions (voir point 1.3.2.).

Comme nous l'avons vu au point 4.2.2. (**Tableau 6**), les dérivés de l'indanesulfonamide sont de bons inhibiteurs d'AC VII ; les  $K_i$  obtenus s'échelonnent de 0,65 nM à 10 nM. Les résultats obtenus vis-à-vis de l'AC XIV sont également très concluants. Par conséquent, nous avons entrepris de tester ces molécules dans un modèle de convulsions induites *in vivo*. Comme certains dérivés (**2, 5, 9, 18, 19, 20, 21, 22, 23**) (**Figure 24**) avaient été précédemment testés par le laboratoire sur le même modèle (Chazalette et al., 2004), seuls les composés **1, 3, 4, 6-8, 10 -17** (**Figure 24**) ont été étudiés.

La technique du « maximal electroshocks seizure » (MES-test) a été utilisée afin d'induire des convulsions chez la souris. Des électrodes sont placées sur l'animal au niveau oculaire. Ces électrodes délivrent un courant de 50 mA durant 20 millièmes de seconde qui induit des convulsions. Une étude réalisée par l'équipe de Matagne (Matagne and Klitgaard, 1998) a démontré que des électrochocs successifs réalisés sur les souris n'engendrent aucune lésion histomorphologique au niveau oculaire.

Les composés à tester originaux et de référence sont injectés par voie intra-péritonéale à une dose de 30 mg/kg, 3 heures avant la stimulation électrique. Les souris non protégées développent normalement une extension tonico-clonique des membres postérieurs correspondant aux convulsions. Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau (**Tableau 7**) ci-contre. Pour chaque composé, les résultats sont exprimés en pourcentage de souris protégées.

En ce qui nous concerne, lors de la stimulation électrique du groupe contrôle positif, nous n'avons pas observé la totalité de cette phase tonico-clonique (absence de l'extension finale qui termine la crise). Cependant, les souris non protégées manifestent une contraction musculaire généralisée, suivie d'un mouvement clonique des pattes postérieures. La queue ainsi que les oreilles de l'animal sont tendues. Lorsque l'animal est replacé délicatement dans sa cage, 2 à 3 minutes lui sont nécessaires afin qu'il reprenne un comportement normal. Toutes les souris de ce groupe ont développé ces différentes manifestations.

Les souris du groupe contrôle négatif sont protégées dans 83% des cas par la drogue de référence : le topiramate. Celle-ci possède divers mécanismes d'action dont l'inhibition de plusieurs isoformes d'ACs impliquées dans la physiopathologie des convulsions.

Ces souris émettent une légère contraction lors de l'influx électrique, cependant on ne peut observer un raidissement généralisé du corps de l'animal. De plus celui-ci ne développe pas de mouvement clonique des pattes antérieures. Lorsqu'il est replacé dans sa cage, l'animal reprend instantanément une attitude normale.

Les résultats obtenus sont très concluants. Pour chacune des molécules, le pourcentage de souris protégées est relativement élevé (58% à 92%). Cependant, certaines souris ne sont qu'à demi protégées par la drogue injectée. Celles-ci manifestent une contraction généralisée, cependant, elles ne développent aucun mouvement rythmique au niveau des pattes.



Le composé **10** protège les souris dans 92% des cas. Lors de l'évaluation sur enzyme isolée, ce composé présentait déjà un profil biologique très intéressant, avec des valeurs de  $K_i$  envers l'AC XII et VII de 7,3 nM et 1,9 nM, respectivement (**Tableau 6**). Deux autres composés présentent un profil biologique similaire au composé **10**. En effet, les molécules **14** et **16** disposent d'un excellent pouvoir inhibiteur vis-à-vis de ces deux isoformes impliquées dans l'étiologie des convulsions, avec des valeurs de  $K_i$  inférieures à 10 nM (**Tableau 6**). L'évaluation de ces composés par MES-test a donné une protection contre les convulsions de 50% pour le composé **14** et 75% pour le composé **16**. Cependant, même lorsque les valeurs de  $K_i$  sont supérieures à 10 nM, les composés induisent une excellente protection des souris contre les convulsions. Cette protection étant similaire ou légèrement inférieure à celle induite par la drogue de référence (topiramate).

Ces premiers résultats permettent de confirmer l'implication des ACs dans la physiopathologie des convulsions. Cependant, ces résultats devront être confirmés par la suite. Etant donné que le groupe contrôle positif n'a pas développé la totalité de la phase tonico-clonique correspondant aux convulsions.



## **Chapitre 5 : Conclusions et perspectives**





## Chapitre 5: Conclusions et perspectives

Trois classes d'anhydrase carbonique (AC) sont répertoriées :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . L'anhydrase de type  $\alpha$  est la seule présente chez les vertébrés supérieurs où seize isoformes ont été découvertes. Elles se caractérisent d'une part, par des localisations subcellulaires et tissulaires différentes et, d'autre part, par une variation de leur activité catalytique.

Cette enzyme se caractérise par la présence d'un ion zincique coordonné à trois histidines et à une molécule d'eau. Elle est entre autre capable de catalyser la réaction d'hydratation du dioxyde de carbone en anion bicarbonate et proton. Par cette activité catalytique, l'AC est impliquée dans un grand nombre de fonctions biologiques variées comme la respiration, la sécrétion d'humeur aqueuse, le remaniement du tissu osseux, ... (Supuran<sup>a</sup> et al., 2004). Cette enzyme joue également un rôle important au niveau cérébral. Elle participe à la formation du liquide cérébro-spinal (LCS), à la régulation du pH indispensable pour un bon fonctionnement des canaux ioniques utilisés dans les phénomènes excitatoires, ... (Thiry<sup>a</sup> et al., 2006).

Plusieurs isoformes d'AC sont plus précisément impliquées dans certaines pathologies dont le cancer et l'épilepsie.

Deux isoenzymes humaines d'AC sont associées aux tumeurs : l'AC IX et XII. L'AC XII est présente dans de nombreux tissus sains et est surexprimée dans certains cancers dont le carcinome de cellules rénales. L'AC IX est uniquement surexprimée au niveau des tissus tumoraux et constitue ainsi une cible pharmacologique intéressante (Pastoreková and Pastorek, 2004).

L'hypoxie présente dans l'environnement de certaine tumeur induit l'expression de l'AC IX par l'intermédiaire du facteur de transcription HIF-1. Cette enzyme interviendrait en conditions d'hypoxie et de normoxie dans la survie des cellules tumorales (Robertson et al., 2004). En effet, l'AC IX fournit les anions bicarbonates utilisés comme substrat dans diverses réactions biosynthétiques indispensables à la croissance cellulaire. Ces réactions permettent la synthèse *de novo* d'acides aminés, de lipides structuraux membranaires, ... De plus, ces enzymes participent à une acidification du milieu extratumoral, favorable à l'activation de diverses protéases intervenant dans la digestion de la matrice extracellulaire. Cette diminution de pH induit la perte de l'intégrité des jonctions intercellulaires, et favorise le processus d'invasion et participe à l'acquisition de phénotypes métastatiques (Pastoreková and Pastorek, 2004).

Une acidification du pH extracellulaire influence négativement la résorption et l'activité de certains médicaments anticancéreux. Cette acidification augmente l'ionisation des bases faibles couramment utilisées en chimiothérapie, diminuant ainsi leur résorption et leur cytotoxicité. Une modulation du pH extracellulaire par un inhibiteur d'AC permettrait de potentialiser la résorption et la cytotoxicité des bases faibles utilisées en chimiothérapie (Stubbs et al., 2000).

Plusieurs isoformes d'AC sont localisés au niveau cérébral dans divers types cellulaires (gaine de myéline, cellules épithéliales du plexus choroïdien, etc) où elles remplissent un rôle physiologique précis en fonction de leur localisation (Thiry<sup>a</sup> et al., 2006).

Les ACs de type VII et XIV seraient plus précisément impliquées dans la physiopathologie des convulsions. Cependant, les relations entre ces isoformes et les mécanismes physiopathologiques des convulsions restent imprécises et compliquées. La synthèse d'iAC présente ainsi de nombreuses perspectives thérapeutiques (Thiry<sup>a</sup> et al., 2006).



Etant donné l'importance de ces deux pathologies en terme de santé publique, des dérivés de l'indanesulfonamide ont été synthétisés au Département de Pharmacie. Le squelette « indanesulfonamide » présente en effet un pouvoir inhibiteur élevé vis-à-vis de l'AC I et II avec des  $K_i$  de 215 nM et 52 nM respectivement (Chazalotte et al., 2004). Diverses pharmacomodulations ont été réalisées autour du noyau indanesulfonamide. Les paramètres principaux évalués sont: la position de substitution sur le noyau indane, la nature du groupement greffé (valproyle, cyclohexyle, pentafluorophényle, tétrafluorophényle,...), la longueur de la chaîne latérale hydrocarbonée linéaire ainsi que la nature du lien utilisé (amide ou thiourée) (Thiry<sup>b</sup> et al., 2006).

Le Département a déjà entrepris une évaluation de l'activité inhibitrice de ces composés sur l'AC IX, AC I et II (Chazalotte et al., 2004).

Dans un premier temps, tous ces dérivés ont été testés pour leur activité inhibitrice sur les isoenzymes XII, XIV et VII humaine et ce de manière à établir diverses relations structure-activité. Ces informations pouvant orienter le Département vers des synthèses ultérieures de composés plus actifs. Pour rappel, l'AC VII et XIV sont impliquées dans la physiopathologie des convulsions. L'AC XII tout comme l'AC IX est impliquée dans le cancer. L'évaluation sur cette isoforme enzymatique permettra de compléter les résultats précédemment obtenus par le Département.

Aucun de nos composés ne s'est distingué par rapport aux autres. En effet, nos drogues présentent un profil biologique très intéressant envers les trois isoformes enzymatiques étudiées. Pour une grande majorité des composés, les  $K_i$  obtenus sont identiques ou inférieures à la drogue choisie comme référence (**AZA**). Ce pouvoir inhibiteur élevé peut s'expliquer par la présence d'un groupement sulfonamide ( $\text{SO}_2\text{NH}_2$ ) ou d'une fonction acide sulfonique ( $\text{SO}_3\text{H}$ ) au sein de chacun des composés. Ces fonctions interagissant facilement avec l'ion zincique présent dans le site actif de l'enzyme. Cette liaison empêche ainsi la conversion de l'eau et du gaz carbonique en ion bicarbonate et proton.

Diverses relations structure-activité ont été observées. Cependant, aucun groupement, lien, position de substitution ne peuvent être privilégiés. Peu de généralités peuvent ainsi être émises concernant ces relations. Les composés ont un comportement différent vis-à-vis des trois isoformes enzymatique étudiées.

Au cours de l'évaluation précédente des composés sur AC IX, deux dérivés d'indanesulfonamide se sont distingués par leur pouvoir inhibiteur élevé et leur sélectivité envers l'AC IX impliquée dans le cancer (Thiry<sup>b</sup> et al., 2006). Ces résultats concluants ont mené à évaluer sur ces composés sur un modèle cellulaire exprimant cette isoforme.

Les cellules utilisées pour l'élaboration de ce modèle, proviennent d'un adénocarcinome mammaire (MCF-7) et expriment l'AC IX. Etant donné que l'AC IX intervient dans le processus d'acidification du milieu extratumoral, nous avons voulu mettre en évidence les modulations de cette acidification lors de l'utilisation d'inhibiteurs d'AC. Toutefois, les résultats de cette étude ont été fort décevants. Aucune des expériences menées n'a permis de mettre en évidence l'effet d'inhibiteur d'AC IX sur l'acidification du milieu extracellulaire. Cependant, il serait prématuré de conclure qu'un inhibiteur d'AC n'induit pas de modulation de l'acidification du milieu. En effet, nous avons utilisé comme drogue de référence le 4-(2-aminoethyl)-benzensulfonamide qui avait démontré une modulation du  $\text{pH}_e$  par l'équipe de Svastova sur les cellules MDCK (Svastova et al., 2004). L'absence de résultats pourrait résider dans le choix de la lignée cellulaire utilisée (MCF-7). Dans la littérature divers mécanismes d'acidification sont attribués à ce type cellulaire dont une activation importante de la voie glycolitique (lactate) ainsi qu'une expression en membrane de pompes à proton ATP-dépendante (Montcourrier et al., 1997).



L'acidification extracellulaire n'est probablement pas la seule conséquence de l'expression de l'AC IX en membrane. Des expériences complémentaires devront être envisagées afin de confirmer ces hypothèses.

Au vu des résultats très concluants obtenus en enzymologie, il nous a semblé intéressant d'investiguer les propriétés de ces composés dans un modèle plus complexe. En effet, la plupart des composés ont un bon pouvoir inhibiteur sur les AC VII et XIV impliquées dans l'épilepsie. Nous avons envisagé de tester nos molécules sur un modèle de convulsions *in vivo*. Nous avons utilisé la technique du « maximal electroshock seizure-test » (MES-test), afin d'induire des convulsions chez la souris.

Nos composés ont donné des résultats plus qu'encourageants. En effet, ceux-ci ont induit une protection des souris dans environ 70% des cas. Ces premiers résultats permettent de confirmer l'implication de ces deux isoformes d'anhydrase carbonique dans la physiopathologie des convulsions puisque leur inhibition induit une protection contre ces crises.

Ce travail ouvre de nombreuses perspectives :

Dans un premier temps, afin d'améliorer le modèle cellulaire utilisé dans l'évaluation *in vitro*, il serait judicieux d'effectuer un dosage du lactate afin de déterminer la provenance exacte de la diminution de pH observé et d'évaluer ainsi l'implication de la glycolyse dans l'acidification du pH<sub>e</sub> des MCF-7. Ce dosage devra être effectué avec les deux milieux de culture utilisés (CO<sub>2</sub> indépendant et « maison »). Chacun de ces milieux pouvant avoir un impact différent sur certaines voies de signalisation impliquées dans la glycolyse. Il serait également intéressant d'investiguer l'utilisation d'inhibiteur de pompes à protons ATP-dépendants (bafilomycine) qui permettra d'évaluer leur implication dans l'acidification du milieu extracellulaire (Montcourrier et al., 1997).

Afin de valider et d'ajuster notre protocole expérimental, des expériences similaires à celles effectuées dans ce travail devront être envisagées sur les cellules de type MDCK utilisées par l'équipe de Svastova (Svastova et al., 2004). Ce type cellulaire a donné d'excellents résultats lors d'une incubation d'inhibiteurs sélectifs d'AC IX. Néanmoins, il ne s'agit pas de cellules cancéreuses « naturelles » puisqu'elles ont subi une transfection afin d'exprimer de façon constitutive l'AC IX. De plus, elles ne présentent pas l'ensemble des caractéristiques typiques des cellules cancéreuses: activation de la glycolyse en condition d'hypoxie, ... Ces cellules transfectées semblent idéales pour déterminer le pouvoir inhibiteur des composés originaux. Cependant, elles ne permettent pas de reconstituer exactement l'environnement extratumoral. Une fois le protocole validé par ce type cellulaire, il serait enrichissant de l'appliquer à une autre lignée cancéreuse exprimant l'AC IX et ne présentant pas d'autres mécanismes d'acidification extratumoral tels que: l'activation de la voie glycolitique ou la surexpression de certaines pompes à proton.

Dans le futur, il serait pertinent d'évaluer ces composés pour leur effet antiprolifératif, sur culture cellulaire et de déterminer ainsi la valeur du GI<sub>50</sub> correspondant à la concentration en inhibiteur nécessaire à la diminution de 50% de la croissance tumorale.



Au vu des résultats encourageants obtenus par l'évaluation *in vivo*, il semblerait intéressant dans un premier temps de valider ces résultats. On pourrait également envisager de déterminer pour chacun des composés une  $ED_{50}$  qui correspond à la dose qui doit être administrée pour obtenir 50% d'activité du composé. Chaque composé sera ainsi testé à plusieurs concentrations sur des groupes de six souris.

Pour mieux comprendre les relations structure-activité obtenues lors de l'évaluation enzymologique sur AC XII, XIV et VII et pour aider le Département à la conception de nouveaux inhibiteurs, il serait intéressant de pouvoir étudier les interactions formées entre les ACs et les ligands (inhibiteurs). Les structures tridimensionnelles (3D) de l'isoenzyme XII humaine et XIV murine étant disponibles dans les banques de données *PDB*, d'excellents programmes informatiques tel que le *docking* GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) permettent une simulation des interactions de l'inhibiteur au sein du site catalytique de l'enzyme.

Un nouveau concept est régulièrement utilisé dans l'évaluation pharmacologique de nouveaux composés : «*Early ADME* ». Ce concept consiste à prévoir et choisir les meilleurs candidats médicaments le plus tôt possible afin d'arrêter au plus vite les frais inutiles.

Les caractéristiques pharmacocinétiques d'un composé chimique, à savoir : l'Absorption, la Distribution, la Métabolisation et l'Elimination sont régulièrement regroupés sous le terme de « caractéristiques ADME d'un composé ».

Dans cette optique, il serait intéressant de déterminer si nos drogues seront bien absorbées au niveau intestinal. A cette fin, les cellules de type caco-2 sont couramment utilisées. Ces cellules proviennent d'un carcinome colorectal et présentent de nombreuses caractéristiques communes avec les entéroctes (morphologie, mécanisme de transport, ...). Ce type cellulaire mime la barrière intestinale et par conséquent cette technique permet de prévoir l'absorption des composés originaux (Artursson et al., 2001).





## **Chapitre 6 : Bibliographie**



## Chapitre 6 : Bibliographie

Artursson, P., Palm, K. & Luthman, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* **46**, 27-43 (2001).

Atkins, M. B., Regan, M. & McDermott, D. Update on the role of interleukin 2 and other cytokines in the treatment of patients with stage IV renal carcinoma. *Clin Cancer Res* **10**, 6342S-6346S (2004).

Barnea, G. et al. Identification of a carbonic anhydrase-like domain in the extracellular region of RPTP gamma defines a new subfamily of receptor tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biol* **13**, 1497-1506 (1993).

Cain, S. M. & Dunn, J. E., 2nd. Low doses of acetazolamide to aid accommodation of men to altitude. *J Appl Physiol* **21**, 1195-1200 (1966).

Cammer, W. B. & Brion, L. P. in *The carbonic anhydrases New Horizons* (eds. Chegwiddden, W. R., Edwards, Y. & Carter, N.) 475-489 (Birkäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2000).

Carmeliet, P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* **69**, 4-10 (2005).

Cha, S. Tight-Binding Inhibitors-I: Kinetic behavior. *Biochem Pharmacol* **24**, 2177-2185 (1975).

Chazalette, C. et al. Carbonic anhydrase inhibitors. Design of anticonvulsant sulfonamides incorporating indane moieties. *Bioorg Med Chem Lett* **14**, 5781-5786 (2004).

Chegwidden, W. R. & Carter, N. D. in *The Carbonic Anhydrases New horizons* (eds. Chegwiddden, W. R., Carter, N. D. & Edwards, Y. H.) 13-28 (Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2000).

Chegwidden, W. R., Carter, N. D. & Edwards, Y. H. *The Carbonic Anhydrases New horizons* (Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2000).

Chegwidden, W. R., Dodgson, S. J. & Spencer, I. M. in *The carbonic anhydrases New Horizons* (eds. Chegwiddden, W. R., Edwards, Y. & Carter, N.) 343-363 (Birkäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2000).

Christianson, D. W. & Fierke, C. A. Carbonic anhydrase: evolution of the zinc binding site by nature and design. *Accounts in Chemical Research* **29**, 331-339 (1996).

Dean, M., Hamon, Y. & Chimini, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research* **42**, 1007-1017 (2001).

Fukumura, D. et al. Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Res* **61**, 6020-6024 (2001).

Garrett, R. H. & Grisham, C. M. *Biochimie* (De Boeck Université, Paris, Bruxelles, 2000).



Gnarra, J. R. et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* **7**, 85-90 (1994).

Hentunen, T. A., Härkönen, P. L. & Väänänen, H. K. in *The carbonic anhydrases New Horizons* 491-497 (Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2000).

Herrero, A. I., Del Olmo, N., Gonzalez-Escalada, J. R. & Solis, J. M. Two new actions of topiramate: inhibition of depolarizing GABA(A)-mediated responses and activation of a potassium conductance. *Neuropharmacology* **42**, 210-220 (2002).

Hilvo, M. et al. Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. *Biochem J* **392**, 83-92 (2005).

Hockel, M. & Vaupel, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* **93**, 266-276 (2001).

Huheey, J. E., Keiter, E. A. & Keiter, R. L. *Chimie inorganique* (De Boeck Université, Paris, Bruxelles, 1996).

Ilies, M. A. et al. Carbonic anhydrase inhibitors: aromatic and heterocyclic sulfonamides incorporating or adamantyl moieties with strong anticonvulsant activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **12**, 2717-2726 (2004).

Ivan, M. et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* **292**, 464-468 (2001).

Ivanov, S. et al. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* **158**, 905-919 (2001).

Ivanov, S. V. et al. Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12596-12601 (1998).

Jaakkola, P. et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**, 468-472 (2001).

Kaluzova, M., Kaluz, S., Lerman, M. I. & Stanbridge, E. J. DNA damage is a prerequisite for p53-mediated proteasomal degradation of HIF-1alpha in hypoxic cells and downregulation of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX. *Mol Cell Biol* **24**, 5757-5766 (2004).

Kato, Y., Nakayama, Y., Umeda, M. & Miyazaki, K. Induction of 103-kDa gelatinase/type IV collagenase by acidic culture conditions in mouse metastatic melanoma cell lines. *J Biol Chem* **267**, 11424-11430 (1992).

Kim, S. J. et al. Expression of HIF-1alpha, CA IX, VEGF, and MMP-9 in surgically resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **49**, 325-335 (2005).

Kivela, A. J. et al. Expression of transmembrane carbonic anhydrase isoenzymes IX and XII in normal human pancreas and pancreatic tumours. *Histochem Cell Biol* **114**, 197-204 (2000).



Kummola, L. et al. Expression of a novel carbonic anhydrase, CA XIII, in normal and neoplastic colorectal mucosa. *BMC Cancer* **5**, 41 (2005).

Kumpulainen, T. & Vaananen, H. K. Immunohistochemical demonstration of extracellular carbonic anhydrase in epiphyseal growth cartilage. *Calcif Tissue Int* **34**, 428-430 (1982).

Laitala, T. & Vaananen, H. K. Inhibition of bone resorption in vitro by antisense RNA and DNA molecules targeted against carbonic anhydrase II or two subunits of vacuolar H(+)-ATPase. *J Clin Invest* **93**, 2311-2318 (1994).

Laitala-Leinonen, T., Lowik, C., Papapoulos, S. & Vaananen, H. K. Inhibition of intravacuolar acidification by antisense RNA decreases osteoclast differentiation and bone resorption in vitro. *J Cell Sci* **112** ( Pt 21), 3657-3666 (1999).

Latif, F. et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* **260**, 1317-1320 (1993).

Lehenkari, P., Hentunen, T. A., Laitala-Leinonen, T., Tuukkanen, J. & Vaananen, H. K. Carbonic anhydrase II plays a major role in osteoclast differentiation and bone resorption by effecting the steady state intracellular pH and Ca<sup>2+</sup>. *Exp Cell Res* **242**, 128-137 (1998).

Lindskog, S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol Ther* **74**, 1-20 (1997).

Liu, R., Page, C., Beidler, D. R., Wicha, M. S. & Nunez, G. Overexpression of Bcl-x(L) promotes chemotherapy resistance of mammary tumors in a syngeneic mouse model. *Am J Pathol* **155**, 1861-1867 (1999).

Mansoor, U. F., Zhang, X.-R. & Blackburn, G. M. in *The carbonic anhydrases New Horizons* (eds. Chegwiddden, W. R., Edwards, Y. & Carter, N.) 437-459 (Birkäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2000).

Maren, T. H. in *The carbonic anhydrases New Horizons* (eds. Chegwiddden, W. R., Edwards, Y. & Carter, N.) 425-435 (Birkäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2000).

Maren, T. H. Carbonic anhydrase: chemistry, physiology, and inhibition. *Physiol Rev* **47**, 595-781 (1967).

Maren, T. H., Brechue, W. F. & Bar-Ilan, A. Relations among IOP reduction, ocular disposition and pharmacology of the carbonic anhydrase inhibitor ethoxzolamide. *Exp Eye Res* **55**, 73-79 (1992).

Marieb, E. N. *Anatomie et physiologie humaines* (De Boeck Université, Paris, Bruxelles, 1999).

Masereel, B., Rolin, S., Abbate, F., Scozzafava, A. & Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors: Anticonvulsant sulfonamides incorporating valproyl and other lipophilic moieties. *Journal of Medicinal Chemistry* **45**, 312-320 (2002).





Matagne, A. & Klitgaard, H. Validation of corneally kindled mice: a sensitive screening model for partial epilepsy in man. *Epilepsy Res* **31**, 59-71 (1998).

Mincione, F., Menabuoni, L. & Supuran, C. T. in *Carbonic anhydrase. Its Inhibitors and Activators* (eds. Supuran, C. T., Scozzafava, A. & Conway, J.) 243-255 (CRC Press, London, 2004).

Montcourrier, P., Silver, I., Farnoud, R., Bird, I. & Rochefort, H. Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism. *Clin Exp Metastasis* **15**, 382-392 (1997).

Nishimori, I. in *Carbonic Anhydrase. Its Inhibitors and Activators* (eds. Supuran, C. T., Scozzafava, A. & Conway, J.) 25-43 (CRC Press, London, 2004).

Nogradi, A. The role of carbonic anhydrases in tumors. *Am J Pathol* **153**, 1-4 (1998).

Pan, P. et al. Carbonic anhydrase gene expression in CA II-deficient (Car2<sup>-/-</sup>) and CA IX-deficient (Car9<sup>-/-</sup>) mice. *J Physiol* **571**, 319-327 (2006).

Pastorekova, S. et al. Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. *Gastroenterology* **112**, 398-408 (1997).

Pastoreková, S. & Pastorek, J. in *Carbonic Anhydrase. Its Inhibitors and Activators* (eds. Supuran, C. T., Scozzafava, A. & Conway, J.) 255-281 (CRC Press, London, 2004).

Pastorekova, S., Zavadova, Z., Kostal, M., Babusikova, O. & Zavada, J. A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system. *Virology* **187**, 620-626 (1992).

Porter, R. J. & Meldrum, B. S. in *Pharmacologie fondamentale et clinique* (ed. Katzung, B. G.) (Piccin, Paris, 2000).

Raghunand, N. et al. Enhancement of chemotherapy by manipulation of tumour pH. *Br J Cancer* **80**, 1005-1011 (1999).

Reynolds, T. Y., Rockwell, S. & Glazer, P. M. Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer Res* **56**, 5754-5757 (1996).

Robertson, N., Potter, C. & Harris, A. L. Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion. *Cancer Res* **64**, 6160-6165 (2004).

Schorderet, M. & collaborateurs, e. *Pharmacologie: Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques* (Frisson-Rocheslatkine, Paris, Genève, 1998).

Scotta, F., Colonna, P. & Andrieu, J.-M. *Cancérologie: Réussir l'internat* (Elipses, Paris, 2002).

Silverman, D. N. & Lindskog, S. The catalytic mechanism of carbonic anhydrase: implication of a rate-limiting protolysis of water. *Acc Chem Res* **21**, 30-36 (1988).

Stams, T. & Christianson, D. W. in *The carbonic anhydrases - New Horizons* (eds. Chegwiddden, W. R., Edwards, Y. & Carter, N.) 159-174 (Birkhäuser Verlag, Basel, 2000).

Stubbs, M., McSheehy, P. M., Griffiths, J. R. & Bashford, C. L. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Mol Med Today* **6**, 15-19 (2000).

Sundquist, K., Lakkakorpi, P., Wallmark, B. & Vaananen, K. Inhibition of osteoclast proton transport by bafilomycin A1 abolishes bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* **168**, 309-313 (1990).

Supuran, C. T. in *Carbonic Anhydrase. Its Inhibitors and Activators* (ed. Conway, J.) 1-23 (CRC Press, London, 2004).

Supuran, C. T. & Scozzafava, A. Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutic potential. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **10**, 575-600 (2000).

Supuran, C. T., Scozzafava, A. & Casini, A. Carbonic anhydrase inhibitors. *Med Res Rev* **23**, 146-189 (2003).

Supuran, C. T., Scozzafava, A. & Conway, J. *Carbonic Anhydrase. Its Inhibitors and Activators* (CRC Press, London, 2004).

Svastova, E. et al. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett* **577**, 439-445 (2004).

Svastova, E. et al. Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-catenin. *Exp Cell Res* **290**, 332-345 (2003).

Swenson, E. R. in *The Carbonic Anhydrases New Horizons* (eds. Chegwiddden, W. R., Carter, N. D. & Edwards, Y. H.) (Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2000).

Taniuchi, K., Nishimori, I., Takeuchi, T., Ohtsuki, Y. & Onishi, S. cDNA cloning and developmental expression of murine carbonic anhydrase-related proteins VIII, X, and XI. *Brain Res Mol Brain Res* **109**, 207-215 (2002).

Tashian, R. E., Hewett-Emmett, D., Carter, N. & Bergenhem, N. C. Carbonic anhydrase (CA)-related proteins (CA-RPs), and transmembrane proteins with CA or CA-RP domains. *Exs*, 105-120 (2000).

Temperini, C., Scozzafava, A., Vullo, D. & Supuran, C. T. Carbonic anhydrase activators. activation of isoforms I, II, IV, VA, VII, and XIV with L- and D-phenylalanine and crystallographic analysis of their adducts with isozyme II: stereospecific recognition within the active site of an enzyme and its consequences for the drug design. *J Med Chem* **49**, 3019-3027 (2006).

Thiry, A., Dogné, J.-M., Masereel, B. & Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors as anticonvulsant agent. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **in press** (2006).

Thiry, A. et al. Indanesulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors. Toward structure-based design of selective inhibitors of the tumor-associated isozyme CA IX. *Journal of Medicinal Chemistry* **49**, 2743-2749 (2006).

Thiry, A. et al. Indanesulfonamide as carbonic anhydrase inhibitors. Towards structure-based design of selective inhibitors of the tumor-associated isoenzyme CA IX. *J. Med. Chem* **49(9)**, 2743-2749 (2006).

Tureci, O. et al. Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7608-7613 (1998).

Vaananen, H. K. et al. Evidence for the Presence of a Proton Pump of the Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase Type in the Ruffled Borders of Osteoclasts. *Journal of Cell Biology* **111**, 1305-1311 (1990).

Vukovic, V. & Tannock, I. F. Influence of low pH on cytotoxicity of paclitaxel, mitoxantrone and topotecan. *Br J Cancer* **75**, 1167-1172 (1997).

Wingo, T., Tu, C., Laipis, P. J. & Silverman, D. N. The catalytic properties of human carbonic anhydrase IX. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **288**, 666-669 (2001).

Winum, J. Y. et al. Carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with boron-containing sulfonamides, sulfamides, and sulfamates: toward agents for boron neutron capture therapy of hypoxic tumors. *Bioorg Med Chem Lett* **15**, 3302-3306 (2005).

Wistrand, P. J. in *The Carbonic Anhydrases : New Horizons* (eds. Chegwiddden, W. R., Carter, N. D. & Edwards, Y. H.) 413-424 (Birkhäuser Verlag, Basel, 2000).

Xu, L. & Fidler, I. J. Acidic pH-induced elevation in interleukin 8 expression by human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* **60**, 4610-4616 (2000).

Zavada, J. et al. Human tumour-associated cell adhesion protein MN/CA IX: identification of M75 epitope and of the region mediating cell adhesion. *Br J Cancer* **82**, 1808-1813 (2000).

Zavada, J. et al. Expression of MaTu-MN protein in human tumor cultures and in clinical specimens. *Int J Cancer* **54**, 268-274 (1993).

Zhou, J., Schmid, T., Schnitzer, S. & Brune, B. Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer Lett* **237**, 10-21 (2006).

## Chapitre 6: Bibliographie

Artursson, P., Palm, K. & Luthman, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev* **46**, 27-43 (2001).

Atkins, M. B., Regan, M. & McDermott, D. Update on the role of interleukin 2 and other cytokines in the treatment of patients with stage IV renal carcinoma. *Clin Cancer Res* **10**, 6342S-6346S (2004).

Barnea, G. et al. Identification of a carbonic anhydrase-like domain in the extracellular region of RPTP gamma defines a new subfamily of receptor tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biol* **13**, 1497-1506 (1993).

Cain, S. M. & Dunn, J. E., 2nd. Low doses of acetazolamide to aid accommodation of men to altitude. *J Appl Physiol* **21**, 1195-1200 (1966).

Cammer, W. B. & Brion, L. P. in *The carbonic anhydrases New Horizons* (eds. Chegwidden, W. R., Edwards, Y. & Carter, N.) 475-489 (Birkäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2000).

Carmeliet, P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* **69**, 4-10 (2005).

Cha, S. Tight-Binding Inhibitors-I: Kinetic behavior. *Biochem Pharmacol* **24**, 2177-2185 (1975).

Chazalette, C. et al. Carbonic anhydrase inhibitors. Design of anticonvulsant sulfonamides incorporating indane moieties. *Bioorg Med Chem Lett* **14**, 5781-5786 (2004).

Chegwidden, W. R. & Carter, N. D. in *The Carbonic Anhydrases New horizons* (eds. Chegwidden, W. R., Carter, N. D. & Edwards, Y. H.) 13-28 (Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2000).

Chegwidden, W. R., Carter, N. D. & Edwards, Y. H. *The Carbonic Anhydrases New horizons* (Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2000).

Chegwidden, W. R., Dodgson, S. J. & Spencer, I. M. in *The carbonic anhydrases New Horizons* (eds. Chegwidden, W. R., Edwards, Y. & Carter, N.) 343-363 (Birkäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2000).

Christianson, D. W. & Fierke, C. A. Carbonic anhydrase: evolution of the zinc binding site by nature and design. *Accounts in Chemical Research* **29**, 331-339 (1996).

Dean, M., Hamon, Y. & Chimini, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research* **42**, 1007-1017 (2001).

Fukumura, D. et al. Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Res* **61**, 6020-6024 (2001).

Garrett, R. H. & Grisham, C. M. *Biochimie* (De Boeck Université, Paris, Bruxelles, 2000).

- Gnarra, J. R. et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* **7**, 85-90 (1994).
- Hentunen, T. A., Härkönen, P. L. & Väänänen, H. K. in *The carbonic anhydrases New Horizons* 491-497 (Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2000).
- Herrero, A. I., Del Olmo, N., Gonzalez-Escalada, J. R. & Solis, J. M. Two new actions of topiramate: inhibition of depolarizing GABA(A)-mediated responses and activation of a potassium conductance. *Neuropharmacology* **42**, 210-220 (2002).
- Hilvo, M. et al. Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. *Biochem J* **392**, 83-92 (2005).
- Hockel, M. & Vaupel, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* **93**, 266-276 (2001).
- Huheey, J. E., Keiter, E. A. & Keiter, R. L. *Chimie inorganique* (De Boeck Université, Paris, Bruxelles, 1996).
- Ilies, M. A. et al. Carbonic anhydrase inhibitors: aromatic and heterocyclic sulfonamides incorporating or adamantyl moieties with strong anticonvulsant activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **12**, 2717-2726 (2004).
- Ivan, M. et al. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* **292**, 464-468 (2001).
- Ivanov, S. et al. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* **158**, 905-919 (2001).
- Ivanov, S. V. et al. Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12596-12601 (1998).
- Jaakkola, P. et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **292**, 468-472 (2001).
- Kaluzova, M., Kaluz, S., Lerman, M. I. & Stanbridge, E. J. DNA damage is a prerequisite for p53-mediated proteasomal degradation of HIF-1alpha in hypoxic cells and downregulation of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX. *Mol Cell Biol* **24**, 5757-5766 (2004).
- Kato, Y., Nakayama, Y., Umeda, M. & Miyazaki, K. Induction of 103-kDa gelatinase/type IV collagenase by acidic culture conditions in mouse metastatic melanoma cell lines. *J Biol Chem* **267**, 11424-11430 (1992).
- Kim, S. J. et al. Expression of HIF-1alpha, CA IX, VEGF, and MMP-9 in surgically resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **49**, 325-335 (2005).
- Kivela, A. J. et al. Expression of transmembrane carbonic anhydrase isoenzymes IX and XII in normal human pancreas and pancreatic tumours. *Histochem Cell Biol* **114**, 197-204 (2000).

- Kumpulainen, T. & Vaananen, H. K. Immunohistochemical demonstration of extracellular carbonic anhydrase in epiphyseal growth cartilage. *Calcif Tissue Int* **34**, 428-430 (1982).
- Laitala, T. & Vaananen, H. K. Inhibition of bone resorption in vitro by antisense RNA and DNA molecules targeted against carbonic anhydrase II or two subunits of vacuolar H(+)-ATPase. *J Clin Invest* **93**, 2311-2318 (1994).
- Laitala-Leinonen, T., Lowik, C., Papapoulos, S. & Vaananen, H. K. Inhibition of intravacuolar acidification by antisense RNA decreases osteoclast differentiation and bone resorption in vitro. *J Cell Sci* **112** ( Pt 21), 3657-3666 (1999).
- Latif, F. et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* **260**, 1317-1320 (1993).
- Lehenkari, P., Hentunen, T. A., Laitala-Leinonen, T., Tuukkanen, J. & Vaananen, H. K. Carbonic anhydrase II plays a major role in osteoclast differentiation and bone resorption by effecting the steady state intracellular pH and Ca<sup>2+</sup>. *Exp Cell Res* **242**, 128-137 (1998).
- Lindskog, S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol Ther* **74**, 1-20 (1997).
- Liu, R., Page, C., Beidler, D. R., Wicha, M. S. & Nunez, G. Overexpression of Bcl-x(L) promotes chemotherapy resistance of mammary tumors in a syngeneic mouse model. *Am J Pathol* **155**, 1861-1867 (1999).
- Mansoor, U. F., Zhang, X.-R. & Blackburn, G. M. in *The carbonic anhydrases New Horizons* (eds. Chegwiddden, W. R., Edwards, Y. & Carter, N.) 437-459 (Birkäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2000).
- Maren, T. H. in *The carbonic anhydrases New Horizons* (eds. Chegwiddden, W. R., Edwards, Y. & Carter, N.) 425-435 (Birkäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2000).
- Maren, T. H. Carbonic anhydrase: chemistry, physiology, and inhibition. *Physiol Rev* **47**, 595-781 (1967).
- Maren, T. H., Brechue, W. F. & Bar-Ilan, A. Relations among IOP reduction, ocular disposition and pharmacology of the carbonic anhydrase inhibitor ethoxzolamide. *Exp Eye Res* **55**, 73-79 (1992).
- Marieb, E. N. *Anatomie et physiologie humaines* (De Boeck Université, Paris, Bruxelles, 1999).
- Masereel, B., Rolin, S., Abbate, F., Scozzafava, A. & Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors: Anticonvulsant sulfonamides incorporating valproyl and other lipophilic moieties. *Journal of Medicinal Chemistry* **45**, 312-320 (2002).
- Matagne, A. & Klitgaard, H. Validation of corneally kindled mice: a sensitive screening model for partial epilepsy in man. *Epilepsy Res* **31**, 59-71 (1998).

- Mincione, F., Menabuoni, L. & Supuran, C. T. in *Carbonic anhydrase. Its Inhibitors and Activators* (eds. Supuran, C. T., Scozzafava, A. & Conway, J.) 243-255 (CRC Press, London, 2004).
- Montcourrier, P., Silver, I., Farnoud, R., Bird, I. & Rochefort, H. Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism. *Clin Exp Metastasis* **15**, 382-392 (1997).
- Nishimori, I. in *Carbonic Anhydrase. Its Inhibitors and Activators* (eds. Supuran, C. T., Scozzafava, A. & Conway, J.) 25-43 (CRC Press, London, 2004).
- Nogradi, A. The role of carbonic anhydrases in tumors. *Am J Pathol* **153**, 1-4 (1998).
- Pan, P. et al. Carbonic anhydrase gene expression in CA II-deficient (Car2<sup>-/-</sup>) and CA IX-deficient (Car9<sup>-/-</sup>) mice. *J Physiol* **571**, 319-327 (2006).
- Pastorekova, S. et al. Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. *Gastroenterology* **112**, 398-408 (1997).
- Pastoreková, S. & Pastorek, J. in *Carbonic Anhydrase. Its Inhibitors and Activators* (eds. Supuran, C. T., Scozzafava, A. & Conway, J.) 255-281 (CRC Press, London, 2004).
- Pastorekova, S., Zavadova, Z., Kostal, M., Babusikova, O. & Zavada, J. A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system. *Virology* **187**, 620-626 (1992).
- Porter, R. J. & Meldrum, B. S. in *Pharmacologie fondamentale et clinique* (ed. Katzung, B. G.) (Piccin, Paris, 2000).
- Raghunand, N. et al. Enhancement of chemotherapy by manipulation of tumour pH. *Br J Cancer* **80**, 1005-1011 (1999).
- Reynolds, T. Y., Rockwell, S. & Glazer, P. M. Genetic instability induced by the tumor microenvironment. *Cancer Res* **56**, 5754-5757 (1996).
- Robertson, N., Potter, C. & Harris, A. L. Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion. *Cancer Res* **64**, 6160-6165 (2004).
- Schorderet, M. & collaborateurs, e. *Pharmacologie: Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques* (Frisson-RocheSlatkine, Paris, Genève, 1998).
- Scotta, F., Colonna, P. & Andrieu, J.-M. *Cancérologie: Réussir l'internat* (Elipses, Paris, 2002).
- Silverman, D. N. & Lindskog, S. The catalytic mechanism of carbonic anhydrase: implication of a rate-limiting protolysis of water. *Acc Chem Res* **21**, 30-36 (1988).
- Stams, T. & Christianson, D. W. in *The carbonic anhydrases - New Horizons* (eds. Chegwidden, W. R., Edwards, Y. & Carter, N.) 159-174 (Biräuser Verlag, Basel, 2000).

Stubbs, M., McSheehy, P. M., Griffiths, J. R. & Bashford, C. L. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Mol Med Today* **6**, 15-19 (2000).

Sundquist, K., Lakkakorpi, P., Wallmark, B. & Vaananen, K. Inhibition of osteoclast proton transport by bafilomycin A1 abolishes bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* **168**, 309-313 (1990).

Supuran<sup>a</sup>, C. T. in *Carbonic Anhydrase. Its Inhibitors and Activators* (ed. Conway, J.) 1-23 (CRC Press, London, 2004).

Supuran, C. T. & Scozzafava, A. Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutic potential. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **10**, 575-600 (2000).

Supuran, C. T., Scozzafava, A. & Casini, A. Carbonic anhydrase inhibitors. *Med Res Rev* **23**, 146-189 (2003).

Supuran<sup>b</sup>, C. T., Scozzafava, A. & Conway, J. *Carbonic Anhydrase. Its Inhibitors and Activators* (CRC Press, London, 2004).

Svastova, E. et al. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett* **577**, 439-445 (2004).

Svastova, E. et al. Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-catenin. *Exp Cell Res* **290**, 332-345 (2003).

Swenson, E. R. in *The Carbonic Anhydrases New Horizons* (eds. Chegwiddden, W. R., Carter, N. D. & Edwards, Y. H.) (Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2000).

Taniuchi, K., Nishimori, I., Takeuchi, T., Ohtsuki, Y. & Onishi, S. cDNA cloning and developmental expression of murine carbonic anhydrase-related proteins VIII, X, and XI. *Brain Res Mol Brain Res* **109**, 207-215 (2002).

Tashian, R. E., Hewett-Emmett, D., Carter, N. & Bergenheim, N. C. Carbonic anhydrase (CA)-related proteins (CA-RPs), and transmembrane proteins with CA or CA-RP domains. *Exs*, 105-120 (2000).

Temperini, C., Scozzafava, A., Vullo, D. & Supuran, C. T. Carbonic anhydrase activators. activation of isoforms I, II, IV, VA, VII, and XIV with L- and D-phenylalanine and crystallographic analysis of their adducts with isozyme II: stereospecific recognition within the active site of an enzyme and its consequences for the drug design. *J Med Chem* **49**, 3019-3027 (2006).

Thiry<sup>a</sup>, A., Dogné, J.-M., Masereel, B. & Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors as anticonvulsant agent. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **in press** (2006).

Thiry<sup>b</sup>, A. et al. Indanesulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors. Toward structure-based design of selective inhibitors of the tumor-associated isozyme CA IX. *Journal of Medicinal Chemistry* **49**, 2743-2749 (2006).



Tureci, O. et al. Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression, and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7608-7613 (1998).

Vaananen, H. K. et al. Evidence for the Presence of a Proton Pump of the Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase Type in the Ruffled Borders of Osteoclasts. *Journal of Cell Biology* **111**, 1305-1311 (1990).

Vukovic, V. & Tannock, I. F. Influence of low pH on cytotoxicity of paclitaxel, mitoxantrone and topotecan. *Br J Cancer* **75**, 1167-1172 (1997).

Wingo, T., Tu, C., Laipis, P. J. & Silverman, D. N. The catalytic properties of human carbonic anhydrase IX. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **288**, 666-669 (2001).

Winum, J. Y. et al. Carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with boron-containing sulfonamides, sulfamides, and sulfamates: toward agents for boron neutron capture therapy of hypoxic tumors. *Bioorg Med Chem Lett* **15**, 3302-3306 (2005).

Wistrand, P. J. in *The Carbonic Anhydrases : New Horizons* (eds. Chegwiddden, W. R., Carter, N. D. & Edwards, Y. H.) 413-424 (Birkhäuser Verlag, Basel, 2000).

Xu, L. & Fidler, I. J. Acidic pH-induced elevation in interleukin 8 expression by human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* **60**, 4610-4616 (2000).

Zavada, J. et al. Human tumour-associated cell adhesion protein MN/CA IX: identification of M75 epitope and of the region mediating cell adhesion. *Br J Cancer* **82**, 1808-1813 (2000).

Zavada, J. et al. Expression of MaTu-MN protein in human tumor cultures and in clinical specimens. *Int J Cancer* **54**, 268-274 (1993).

Zhou, J., Schmid, T., Schnitzer, S. & Brune, B. Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer Lett* **237**, 10-21 (2006).